

**LUCIANA BALESTRIN**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ALELOPÁTICA, ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE  
*Dorstenia multiformis* MIQUEL, MORACEAE**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilis Dallarmi  
Miguel  
Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes  
Miguel

**CURITIBA**

**2006**

Dedico este trabalho a Deus, e aos meus pais e irmãos, pela paciência e amor.

Ao meu namorado José,  
por incentivar e compartilhar  
todos os momentos da  
execução deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação.

À Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel, pela orientação e amizade.

Ao Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pela dedicação e paciência.

Ao Botânico Dr. Gert Hatschbach, pela identificação da espécie vegetal.

À indústria farmacêutica As Ervas Curam, pela doação do material vegetal.

Ao laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR, representado pela Prof<sup>a</sup> Wanda N. Abrahão e Geni Peruzzo, pela cooperação na avaliação da atividade antibacteriana.

Ao Departamento de Química, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luiza, pelas análises de ressonância nuclear magnética.

À Clézia, pela análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Aos amigos João e Josiane, pelo auxílio.

Em especial à amiga Cláudia Alexandra de Andrade, companheira na realização dos ensaios biológicos.

Ao Paulo da Farmacotécnica e à Hilda da Fitoquímica, pela colaboração.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS .....  | viii |
| LISTA DE GRÁFICOS.....  | x    |
| LISTA DE QUADROS E TABELAS.....                                     | xi   |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....                       | xii  |
| RESUMO.....   | xiv  |
| ABSTRACT .....  | xv   |
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 01   |
| 2 OBJETIVOS .....   | 04   |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....  | 04   |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                     | 04   |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA .....                                       | 05   |
| 3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO.....                                   | 05   |
| 3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA MORACEAE.....                     | 05   |
| 3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Dorstenia</i> .....             | 06   |
| 3.3.1 Aspectos fitoquímicos do gênero <i>Dorstenia</i> .....        | 07   |
| 3.3.1.1 Cumarinas, triterpenos e esteróides.....                    | 07   |
| 3.3.1.2 Flavonóides .....   | 11   |
| 3.3.1.3 Estirenos .....   | 16   |
| 3.3.2 Aspectos farmacológicos do gênero <i>Dorstenia</i> .....      | 17   |
| 3.3.3 Aspectos toxicológicos do gênero <i>Dorstenia</i> .....       | 18   |
| 3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Dorstenia multiformis</i> , MIQUEL ..... | 19   |
| 3.4.1 Sinonímia vulgar.....   | 19   |
| 3.4.2 Sinonímia científica .....                                    | 19   |
| 3.4.3 Distribuição geográfica.....                                  | 19   |
| 3.4.4 Usos populares .....  | 20   |
| 3.4.5 Descrição botânica de <i>Dorstenia multiformis</i> .....      | 21   |
| 3.4.6 Aspectos fitoquímicos de <i>Dorstenia multiformis</i> .....   | 22   |
| 3.4.7 Aspectos toxicológicos de <i>Dorstenia multiformis</i> .....  | 23   |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 24   |
| 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....                               | 24   |
| 4.2 CONSERVAÇÃO .....   | 24   |
| 4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....                        | 24   |
| 4.4 ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS.....                                    | 26   |
| 4.5 TEOR DE SÓLIDOS .....   | 26   |
| 4.6 PESQUISA DE GRUPOS FITOQUÍMICOS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....     | 27   |
| 4.6.1 Extrato alcoólico 20%.....                                    | 28   |
| 4.6.1.1 Pesquisa de alcalóides.....                                 | 28   |
| 4.6.1.2 Pesquisa de flavonóides.....                                | 29   |
| 4.6.1.2.1 Leucoantocianidinas .....                                 | 29   |
| 4.6.1.2.2 Heterosídeos flavônicos .....                             | 29   |
| 4.6.1.2.3 Flavonóis .....   | 30   |
| 4.6.1.2.4 Dihidroflavonóides.....                                   | 30   |
| 4.6.1.2.5 Dihidroflavonóis.....                                     | 31   |
| 4.6.1.3 Pesquisa de cumarinas .....                                 | 31   |
| 4.6.1.4 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....               | 33   |
| 4.6.1.5 Pesquisa de esteróides e triterpenos .....                  | 33   |

|   |    |
|---|----|
| 4.6.1.5.1 Reação de Liberman-Bouchard.....  | 34 |
| 4.6.1.5.2 Reação de Keller Kelliani .....   | 34 |
| 4.6.2 Extrato aquoso .....  | 34 |
| 4.6.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos .....                                       | 35 |
| 4.6.2.1.1 Primeiro teste .....  | 35 |
| 4.6.2.1.2 Segundo teste .....   | 35 |
| 4.6.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....   | 36 |
| 4.6.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos .....                                       | 36 |
| 4.6.2.4 Pesquisa de ácidos voláteis .....   | 37 |
| 4.6.2.5 Pesquisa de taninos .....   | 37 |
| 4.6.2.5.1 Diferenciação entre taninos hidrolisáveis e condensáveis .....                  | 38 |
| 4.6.2.6 Pesquisa de ácidos fixos.....   | 38 |
| 4.6.2.7 Pesquisa de aminogrupos .....   | 39 |
| 4.7 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....  | 39 |
| 4.7.1 Isolamento de compostos da porção solúvel em acetona.....                           | 39 |
| 4.7.2 Identificação dos compostos isolados da porção solúvel em acetona ....              | 42 |
| 4.7.2.1 Análise via CLAE da amostra CRS1 .....  | 42 |
| 4.7.3 Isolamento de compostos da porção não solúvel em acetona.....                       | 43 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....  | 43 |
| 4.8.1 Preparo do material.....  | 44 |
| 4.8.2 Preparo das amostras .....  | 44 |
| 4.8.3 Preparo dos discos de papel.....  | 45 |
| 4.8.4 Meio de cultura.....  | 45 |
| 4.8.5 Preparo do inóculo .....  | 46 |
| 4.8.6 Teste de atividade antibacteriana.....  | 46 |
| 4.9 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA.....                                      | 47 |
| 4.9.1 Preparo do inóculo .....  | 47 |
| 4.9.2 Preparo das amostras .....  | 48 |
| 4.9.3 Teste da concentração mínima inibitória.....  | 48 |
| 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....  | 48 |
| 4.10.1 Preparo das amostras.....  | 49 |
| 4.10.2 Preparo do material.....   | 50 |
| 4.10.3 Teste de germinação.....   | 51 |
| 4.10.4 Teste de crescimento .....   | 51 |
| 4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....   | 52 |
| 4.11.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio .....                                | 52 |
| 4.11.2 Abordagem do potencial antioxidante por cromatografia em camada<br>delgada.....    | 53 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 54 |
| 5.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....                                     | 54 |
| 5.2 TEOR DE SÓLIDOS NO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E NAS<br>FRAÇÕES.....                      | 54 |
| 5.3 PESQUISA DE GRUPOS FITOQUÍMICOS NOS EXTRATOS E<br>FRAÇÕES.....                        | 55 |
| 5.3.1 Análise sistemática com extrato alcoólico 20%.....                                  | 55 |
| 5.3.2 Análise sistemática com extrato aquoso .....  | 57 |
| 5.4 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....   | 58 |
| 5.4.1 Análises realizadas em cromatografia em camada delgada .....                        | 58 |
| 5.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES<br>NAS AMOSTRAS CRS1 E CRS2 ..... | 60 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.5.1 Identificação dos compostos presentes na amostra CRS1 por cromatografia gasosa acoplada a massa ..... | 60         |
| 5.5.2 Ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio da amostra CRS1 .....                           | 66         |
| 5.5.3 Ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio da amostra CRS2 .....                           | 66         |
| 5.6 CROMATOGRAMA DA AMOSTRA CRS1 EM CLAE UTILIZANDO COMO PADRÃO PSORALENO E BERGAPTENO .....                | 82         |
| 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....   | 83         |
| 5.7.1 Difusão em ágar .....   | 83         |
| 5.7.2 Concentração inibitória mínima .....  | 87         |
| 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....   | 90         |
| 5.8.1 Avaliação da germinação .....   | 90         |
| 5.8.2 Avaliação do crescimento.....   | 92         |
| 5.8.2.1 Avaliação da porcentagem de crescimento de <i>Lactuca sativa</i> .....                              | 93         |
| 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....  | 95         |
| 5.9.1 Ensaio pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.....  | 95         |
| 5.9.2 Ensaio pelo método de cromatografia em camada delgada.....  | 98         |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>102</b> |
| <b>ANEXO .....</b>  | <b>107</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 – DIHIDROFURANOCUMARINA ISOLADA DE <i>Dorstenia contrajerva</i> .....   | 08 |
| FIGURA 2 – FURANOCUMARINAS PRESENTES EM <i>Dorstenia excentrica</i> .....  | 09 |
| FIGURA 3 – CUMARINA PRESENTE EM <i>Dorstenia poinsettifolia</i> .....  | 09 |
| FIGURA 4 – FURANOCUMARINA E DERIVADO BENZOFURANO DE <i>Dorstenia gigas</i> .....   | 10 |
| FIGURA 5 – FLAVONAS E DERIVADO BENZOFURANO DE <i>Dorstenia Psilurus</i> .....  | 12 |
| FIGURA 6 – FLAVONÓIDE ISOLADO DE <i>Dorstenia barteri</i> .....  | 13 |
| FIGURA 7 – FLAVONÓIDE PRENILADO DE <i>Dorstenia poinsettifolia</i> .....   | 14 |
| FIGURA 8 – FLAVONÓIDE PRENILADO DE <i>Dorstenia psilurus</i> .....   | 14 |
| FIGURA 9 – FLAVONÓIDES PRENILADOS DE <i>Dorstenia mannii</i> .....   | 16 |
| FIGURA 10 – ESTRUTURA DA SIRIOGENINA .....   | 18 |
| FIGURA 11 – A ESPÉCIE <i>Dorstenia multiformis</i> , MIQUEL, MOSTRANDO AS RAÍZES E PARTES AÉREAS .....   | 23 |
| FIGURA 12 – A ESPÉCIE <i>Dorstenia multiformis</i> , MIQUEL, MOSTRANDO DIMENSÕES DAS RAÍZES E PARTES AÉREAS .....                                | 23 |
| FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, RESÍDUO RESULTANTE E FRAÇÕES .....  | 26 |
| FIGURA 14 – FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO FRACIONAMENTO DA PORÇÃO SOLÚVEL EM ACETONA .....   | 42 |
| FIGURA 15 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA COM A PORÇÃO SOLÚVEL EM ACETONA .....                   | 60 |
| FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DE CG/EM, RELATIVO À ANÁLISE DA AMOSTRA CRS1 .....  | 62 |
| FIGURA 17 – ESPECTRO DE MASSA DA AMOSTRA CRS1 PARA PSORALENO, COM TEMPO DE RETENÇÃO EM 11,19 .....   | 63 |
| FIGURA 18 – ESPECTRO DE MASSA DO PSORALENO DATABASE/NIST 1998, PARA COMPARAÇÃO COM ESPECTRO DO CROMATOGRAMA COM O TEMPO DE RETENÇÃO 11,19 ...    | 64 |
| FIGURA 19 – ESPECTRO DE MASSA DA AMOSTRA CRS1 PARA BERGAPTENO, COM TEMPO DE RETENÇÃO EM 13,39 .....  | 65 |
| FIGURA 20 – CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A MASSA PARA BERGAPTENO DATABASE/NIST98 .....  | 60 |
| FIGURA 21 – ESPECTRO DE MASSA DA AMOSTRA CRS1 PARA O ISOPSORALENO, COM TEMPO DE RETENÇÃO EM 11,19 ...  | 66 |
| FIGURA 22 – ESPECTRO DE MASSA DO ISOPSORALENO DATABASE/NIST 1998, PARA COMPARAÇÃO COM ESPECTRO DO CROMATOGRAMA COM TEMPO DE RETENÇÃO 11,19 ..... | 67 |
| FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (200 MHZ em CDCl <sub>3</sub> ) PARA O PSORALENO, BERGAPTENO E ISOPSORALENO .....                    | 72 |
| FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ em CDCl <sub>3</sub> ) PARA O PSORALENO E BERGAPTENO .....                                   | 73 |
| FIGURA 25 – ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN <sup>1</sup> H PARA COMPOSTOS ISOLADOS DA AMOSTRA CRS1 .....   | 74 |



|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ALFA AMIRINA .....   | 77  |
| FIGURA 27 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BETA AMIRINA.....  | 77  |
| FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DA AMOSTRA CRS2 DE 3α-o-<br>acetato de α-amirina e 3 β-o-acetato de β-amirina .....   | 78  |
| FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C EXPANSÃO REFERENTE DE 14<br>A 33 ppm PARA AMOSTRA CRS2 DE 3α-o-acetato de α-<br>amirina e 3β-o-acetato β-amirina .....                          | 79  |
| FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C EXPANSÃO REFERENTE DE 32<br>A 60 ppm PARA AMOSTRA CRS2 DE 3α-o-acetato de α-<br>amirina e 3β-o-acetato β-amirina .....                          | 80  |
| FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C EXPANSÃO REFERENTE DE 95<br>A 190 ppm PARA FRAÇÃO CRS2 DE 3α-o-acetato de α-<br>amirina e 3 β-o-acetato β-amirina.....                          | 81  |
| FIGURA 32 – ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN – <sup>1</sup> H NA FAIXA DE 0,0 A<br>7,5 ppm DA AMOSTRA CRS2 CORRESPONDENTE A 3α-<br>o-acetato de α-amirina e 3 β-o-acetato de β-amirina amirina ... | 82  |
| FIGURA 33 – ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN <sup>1</sup> H NA FAIXA DE 4,20 a<br>5,50 REFERENTE A CRS2 DE 3α-o-acetato de α-amirina e<br>3-β-o-acetato de β-amirina.....                          | 83  |
| FIGURA 34 – CROMATOGRAMA POR CLAE DA AMOSTRA CRS1 .....   | 84  |
| FIGURA 35 – CONTROLE DE ESTERILIDADE DO ENSAIO .....  | 88  |
| FIGURA 36 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FRAÇÃO<br>CLOROFÓRMIO PARA <i>S. aureus</i> .....   | 89  |
| FIGURA 37 – FOTOGRAFIA DO MIC PARA A FRAÇÃO HEXANO, COM A<br>BACTÉRIA <i>Escherichia coli</i> .....   | 91  |
| FIGURA 38 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO ENSAIO DE REDUÇÃO<br>DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA O EXTRATO<br>ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS<br>ISOLADAS.....                          | 98  |
| FIGURA 39 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO ENSAIO DE<br>CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....  | 101 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE<br><i>Lactuca sativa</i> .....   | 94 |
| GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE<br><i>Lactuca sativa</i> ..... | 95 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|  |    |
|--|----|
| QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Dorstenia multiformis</i> .....  | 05 |
| TABELA 1 – QUANTIDADES DAS AMOSTRAS IMPREGNADAS NOS DISCOS DE PAPEL, EM µg.....  | 45 |
| TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Dorstenia multiformis</i> .....                                     | 54 |
| TABELA 3 – TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Dorstenia multiformis</i> .....  | 55 |
| TABELA 4 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Dorstenia multiformis</i> .....   | 57 |
| TABELA 5 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO.....  | 58 |
| TABELA 6 – DESLOCAMENTOS EM ppm DO ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H PARA SUBSTÂNCIA ISOLADA PSORALENO .....                    | 67 |
| TABELA 7 – DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H PARA SUBSTÂNCIA ISOLADA BERGAPTENO .....                             | 68 |
| TABELA 8 - DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H PARA SUBSTÂNCIA ISOLADA ISOPSORALENO.....                            | 69 |
| TABELA 9 – VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE RMN <sup>13</sup> C/DEPT/ <sup>1</sup> H (CDCLI, TMS, Δ) PARA A AMOSTRA CRS2.....                | 74 |
| TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA AMOSTRA CRS1 .....   | 83 |
| TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>Dorstenia multiformis</i> , POR DIFUSÃO EM ÁGAR .....   | 84 |
| TABELA 12 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>Dorstenia multiformis</i> – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....                                    | 89 |
| TABELA 13 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> NO ENSAIO ALELOPÁTICO .....        | 91 |
| TABELA 14 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactuca sativa</i> .....  | 93 |
| TABELA 15 – VALORES DE ABSORBÂNCIA, RELATIVOS AO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Dorstenia multiformis</i> , a 695NM ..... | 97 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| $\alpha$                             | Alfa  |
| ACN                                  | Acetonitrila                                      |
| ANVISA                               | Agência Nacional de Vigilância Sanitária          |
| ATCC                                 | American Type Culture Collection                  |
| $\beta$                              | Beta  |
| BaCl <sub>2</sub>                    | Cloreto de bário                                  |
| °C                                   | Graus Celsius                                     |
| C                                    | Carbono   |
| Ca(OH) <sub>2</sub>                  | Hidróxido de cálcio                               |
| CCD                                  | Cromatografia em camada delgada                   |
| CDCl <sub>3</sub>                    | Clorofórmio deuterado                             |
| CG/EM                                | Cromatografia gasosa/espectrometria de massa      |
| CLAE                                 | Cromatografia líquida de alta eficiência          |
| cm                                   | Centímetro  |
| CRS1                                 | Composto do resíduo solúvel em acetona 1          |
| CRS2                                 | Composto do resíduo solúvel em acetona 2          |
| DPPH                                 | Difenil-picril-hidrazil                           |
| <i>E. coli</i>                       | <i>Escherichia coli</i>                           |
| FeCl <sub>3</sub>                    | Cloreto férrico                                   |
| g                                    | Grama   |
| HCl                                  | Ácido clorídrico                                  |
| H <sub>2</sub> O                     | Água  |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>       | Ácido fosfórico                                   |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | Ácido sulfúrico                                   |
| IVG                                  | Índice de velocidade de germinação                |
| Kg                                   | Kilograma   |
| KOH                                  | Hidróxido de potássio                             |
| M                                    | Molar   |
| MeOH                                 | Metanol   |
| mg                                   | Miligrama   |
| min                                  | Minuto  |
| MHz                                  | Megahertz   |
| MIC                                  | Concentração mínima inibitória                    |
| mL                                   | Mililitro   |
| mm                                   | Milímetro   |
| $\mu$                                | Micro   |
| N                                    | Normal  |
| NaOH                                 | Hidróxido de sódio                                |
| Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>      | Fosfato de sódio                                  |
| NH <sub>4</sub> OH                   | Hidróxido de amônio                               |
| nm                                   | Nanômetro   |
| OH                                   | Hidroxila   |
| p                                    | Página  |
| ppm                                  | Parte por milhão                                  |
| p/v                                  | Peso/volume                                       |
| ®                                    | Marca registrada                                  |
| RDC                                  | Resolução da diretoria colegiada                  |
| RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C | Ressonância magnética nuclear de próton e carbono |

TMSO  
UFPR  
UV  
v/v

Tetrametilsilano  
Universidade Federal do Paraná  
Ultravioleta  
Volume/volume

## RESUMO

O presente trabalho realizou estudo sobre *Dorstenia multiformis*, Miquel, pertencente à família Moraceae, utilizando-se todas as partes da planta. À partir do resíduo obtido do extrato bruto etanólico, por meio de separação em coluna cromatográfica de sílica-gel, obteve-se 4,5g de um material cristalino denominado CRS1 e 80,8mg de material denominado CRS2. Da análise de CG/EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  na amostra CRS1, e após doseamento por CLAE, verificou-se a presença de 90% de psoraleno e 10% de bergapteno. Da análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  realizada com a amostra CRS2, identificou-se dois constituintes: acetato de  $\alpha$ -amirina e acetato de  $\beta$ -amirina. O extrato etanólico bruto, frações e substâncias isoladas foram avaliados quanto ao seu potencial biológico, por meio dos ensaios de atividade alelopática, antibacteriana e antioxidante. Para avaliação da atividade alelopática verificou-se a velocidade de germinação e o comprimento da radícula e do hipocótilo de sementes de *Lactuca sativa*, em presença das amostras e controles água destilada e metanol. A verificação da atividade antibacteriana foi realizada por meio dos testes de difusão em disco e concentração inibitória mínima, e a atividade antioxidante foi verificada através dos testes de redução do complexo fosfomolibdênio e reação com DPPH em placa cromatográfica. Os resultados obtidos com o estudo alelopático indicaram influência inibitória do extrato etanólico bruto e das frações sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa*, em várias concentrações testadas. O crescimento da radícula e do hipocótilo das sementes foi influenciado inibitoriamente pela fração hexano nas maiores concentrações testadas. O extrato etanólico bruto inibiu o desenvolvimento da bactéria *Salmonella thiphymurium*, e a bactéria *Staphylococcus epidermidis* teve seu crescimento inibido em presença das frações hexano e clorofórmio. Todas as amostras testadas apresentaram certo grau de atividade antioxidante, especialmente a fração clorofórmio.

Palavras chave: alelopatia, fitoquímica, atividade antibacteriana e antioxidante.

## ABSTRACT

The present work is a study about *Dorstenia multiformis*, Miquel, which belong to Moraceae family, utilizing all the parts of the plant. From the residue obtained from the ethanolic gross extract through separation on chromatographic columns of silica-gel, it was obtained 4,5g of a crystalline material called CRS1 and 80,8mg of a material called CRS2. From the analysis of CG/MS and RMN  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  on the sample CRS1, and after dosage by HPLC it was verified the presence of 90% psoraleno and 10% bergapteno. From the analysis of RMN  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  developed with the sample CRS2, two constituents were identified:  $\alpha$ -amirina acetate and  $\beta$ -amirina acetate. The gross ethanolic extract, fractions and isolated substances were evaluated in relation to its biological potential through assays of alelopathic, antibacterial and antioxidating activity. In order to evaluate the alelopathic activity it was verified the germination speed and the radicle and hypocotyl length of *Lactuca sativa* seeds, in the presence of samples and distilled water and methanol control. The verification of antibacterial activity was developed through disc diffusion and minimal inhibitory concentration tests, and the antioxidating activity was verified through tests of phosphomolibdeny complex reduction and reaction with DPPH on chromatographic plate. The obtained results with the alelopathic study showed inhibitory influence of gross ethanolic extract and fractions on *Lactuca sativa* seeds germination, for several tested concentrations. The growth of seeds radicles and hypocotyl had the inhibitory influence by hexano fraction on the highest concentrations tested. The gross ethanolic extract inhibited the development of bacteria *Salmonella thiphymurium*, and bacteria *Staphylococcus epidermidis* had its growth inhibited in the presence of hexano and chloroform fractions. All the tested samples showed a certain degree of antioxidating activity, specially the chloroform fraction.

Key-words: alelopathy, phytochemistry, antibacterial and antioxidating activity.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca do homem por soluções que pudessem aplacar suas dores e doenças foi sempre incessante e remonta seu aparecimento na face da Terra (SILVA, 2001).

Nesse contexto, desde os primórdios das civilizações, as plantas têm sido utilizadas pelo homem, como fonte de alimento e de tratamento de doenças, devido à sua abundância na natureza e facilidade de obtenção. O emprego das plantas no controle de diversas doenças e pragas talvez seja tão antigo quanto o próprio aparecimento da humanidade (FRANÇA, 2001). Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas mais antigas civilizações, onde o homem primitivo, ao procurar plantas para o seu sustento, foi descobrindo espécimes com ação tóxica ou medicinal. Os benefícios obtidos com a utilização empírica levaram o homem a buscar sempre “novas” plantas, para o tratamento de diversas patologias, e a experiência acumulada foi transmitida por inúmeras gerações, levando ao descobrimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna (SIMÕES e colaboradores, 1986).

Além dos benefícios, observou-se muitas reações tóxicas associadas a plantas, levando à necessidade de estudos criteriosos relativos à sua utilização. Diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos, principalmente nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO & BRITO, 1993). Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 500.000 espécies de plantas terrestres, das quais são conhecidos aproximadamente 50.000 metabólitos secundários (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Em nosso país, há uma grande diversidade de plantas com potencial terapêutico, o que estimula os pesquisadores no estudo de suas possíveis ações terapêuticas, bem como ações tóxicas, a fim de produzir medicamentos com garantia de eficácia e segurança. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade, em termos



de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permitiu aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem se constituir em modelos tanto para a síntese de fármacos quanto de outros produtos para aplicação agrícola ou florestal (GUERRA; NODARI, 2001).

Os resultados dos estudos e pesquisas acerca das propriedades antimicrobianas de produtos obtidos de plantas têm sido promissores, sendo que muitos compostos químicos têm sido isolados de espécies vegetais brasileiras e de outras partes do mundo, com potente atividade antimicrobiana, de grande interesse para a indústria farmacêutica e a medicina (YUNES e CALIXTO, 2001).

Esses estudos possibilitam a obtenção de moléculas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos, com efeitos desejáveis e específicos, e sem efeitos colaterais ao hospedeiro (RECIO e colaboradores, 1989; MITSHER e colaboradores, 1987; YUNES e CALIXTO, 2001).

A busca por herbicidas que possam ser extraídos de fontes naturais é essencialmente importante para as plantas medicinais, uma vez que não é recomendado o uso de agrotóxicos sintéticos no cultivo destas, podendo haver contaminação com resíduos tóxicos, ocasionando problemas para a saúde, além de poder causar redução na concentração dos princípios ativos do vegetal (REIS; MARIOT, 2001).

Ao se tratar da qualidade de uma droga com fins medicinais, o principal parâmetro a ser considerado é a correta identidade botânica, e, nesse contexto, a análise fitoquímica qualitativa apresenta-se como uma importante análise nos processos de inspeção da matéria-prima vegetal, uma vez que, a partir da publicação, pela ANVISA, da RDC nº17, em 24 de fevereiro de 2000, o fabricante de fitoterápicos passa a ser responsável por comprovar as indicações e a dosagem, baseando-se na padronização de marcadores químicos, e utilizando-os, inclusive, no controle de qualidade da matéria-prima.

Existem vários estudos fitoquímicos relativos ao gênero *Dorstenia*, porém não há estudos fitoquímicos específicos para a *Dorstenia multiformis*,

que é amplamente utilizada no Brasil, em formulações para tratamento de distúrbios menstruais, bem como outras indicações, em diversas formas farmacêuticas. Dentro do gênero *Dorstenia* existem várias espécies conhecidas popularmente como “carapiás” ou “caiapiás”, todas elas dotadas de propriedades medicinais e, na grande maioria desse comércio, a espécie não é identificada (FLORA BRASILEIRA, 1983).

Dessa forma, para garantir a qualidade das formulações, torna-se necessário identificar um marcador químico específico, assegurando a utilização da espécie na produção dos medicamentos.

Vários trabalhos acadêmicos e artigos indicam que diversos tipos de danos teciduais, inclusive em tecidos vitais, são causados por grupos de substâncias químicas, conhecidas como radicais livres, produzidas naturalmente em grandes quantidades no organismo. Dessa forma, já se conhece bastante sobre o papel dos radicais livres na produção de doenças, buscando-se agora tentativas de intervenção que possam minimizar os danos causados. Tais intervenções precisam, obviamente, assumir a forma de um ataque aos radicais livres, e este se dá pelo uso de substâncias com atividade antioxidante (YOUNGSON, 1996).

Todas essas proposições justificam o estudo químico e biológico da espécie *Dorstenia multiformis*, com o intuito de contribuir para a qualidade das formulações já existentes, bem como identificar ativos com possibilidade de aplicação em formulação farmacêutica.

Considere-se ainda que, de acordo com as perspectivas da modernidade, a saúde do futuro estará voltada para a medicina preventiva, onde a ciência buscará na natureza meios profiláticos que auxiliem o homem na defesa de seus males (MIGUEL, 1999).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo da composição química de *Dorstenia multiformis*, Miquel e verificar possíveis aplicações biológicas da espécie, por meio de seus constituintes químicos presentes no extrato bruto, frações, ou isoladamente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar e isolar compostos químicos presentes no extrato etanólico e respectivas frações de *Dorstenia multiformis* M.

Identificar os constituintes químicos isolados, a partir da análise de dados obtidos por espectrometrias de CG/EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Avaliar atividade antibacteriana do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de *Dorstenia multiformis* M.

Avaliar atividade antioxidante do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de *Dorstenia multiformis* M.

Avaliar atividade alelopática do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de *Dorstenia multiformis* M.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

O enquadramento taxonômico de *Dorstenia multiformis*, Moraceae, segundo CRONQUIST (1981) e ENGLER (1998), está demonstrado no quadro 1.

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Dorstenia multiformis*

|           | ENGLER (JOLY, 1998) | CRONQUIST (1981)   |
|-----------|---------------------|--------------------|
| Divisão   | Angiospermae        | Magnoliophyta      |
| Classe    | Dicotyledoneae      | Magnoliopsida      |
| Subclasse | Archichlamydeae     | Hamamelidae        |
| Ordem     | Urticales           | Urticales          |
| Família   | Moraceae            | Moraceae           |
| Gênero    | <i>Dorstenia</i>    | <i>Dorstenia</i>   |
| Espécie   | <i>multiformis</i>  | <i>Multiformis</i> |

#### 3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA MORACEAE

As plantas da família Moraceae são predominantemente arbóreas ou arbustivas, sendo raras as herbáceas. Caracterizam-se por apresentar folhas inteiras, dispostas alternadamente, simples ou, raramente, compostas, sempre protegidas no botão por duas estípulas (JOLY, 1975). Frequentemente, apresentam as paredes celulares, especialmente da epiderme ou tricomas, mineralizadas com carbonato de cálcio ou sílica; estômatos anomocíticos; presença de estípulas, porém, algumas vezes, em número reduzido, como ocorre no gênero *Dorstenia* (CRONQUIST, 1981).

As flores são muito pequenas, de sexo separado, reunidas em densas inflorescências, protegidas por séries de elementos do perianto (em número de 2 a 6). Flores masculinas com estames isômeros e opostos aos segmentos do perianto. Flores femininas com perianto rudimentar ou ausente, constituídas por um ovário súpero composto de 2 carpelos e um só lóculo (dos 2 carpelos,

muitas vezes só um se desenvolve) com um só óvulo. Estigmas 2, estiletos 2 (JOLY, 1975).

Fruto drupáceo, com exocarpo descendente, com sementes perenes, o receptáculo comum freqüentemente amadurece com os ovários, formando um sicônio carnudo. As sementes possuem embrião reto ou, mais freqüentemente, curvado, os cotilédones freqüentemente desiguais, algumas vezes um dos cotilédones encontra-se totalmente suprimido; endosperma carnudo e oleoso (CRONQUIST, 1981).

A família é composta de cerca de 61 gêneros, com mais de 1000 espécies, e se encontra bem representada no Brasil, tanto por espécies indígenas, quanto por cultivadas. É freqüente, de um modo geral, nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo menos comum em climas temperados. Os gêneros mais numerosos da família são *Ficus*, com cerca de 600 espécies; *Dorstenia*, com aproximadamente 125 espécies, e *Cecropia*, com cerca de 50 espécies (JOLY, 1975; CRONQUIST, 1981).

Entre os gêneros nativos no Brasil, destacam-se *Ficus*, *Brosimum*, *Dorstenia* e *Cecropia* (JOLY, 1975).

### 3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Dorstenia*

O gênero *Dorstenia*, conhecido popularmente como caapiá ou carapiá, é um exemplo de erva na família e se caracteriza pelas inflorescências disciformes (resultantes da fusão dos pedúnculos) com flores sésseis inseridas no lado superior (JOLY, 1975).

Segundo ABEGAZ e colaboradores (2002), o gênero *Dorstenia* possui muitas plantas que são utilizadas como anti-oftálmicas, anti-infecciosas e anti-reumáticas, na terapia medicamentosa à base de plantas medicinais, em muitos países da África e Américas do Sul e Central.

Várias espécies de *Dorstenia* são utilizadas na medicina humana, principalmente contra doenças de pele, por causa da presença de compostos biologicamente ativos. A ocorrência de furanocumarinas tem sido amplamente demonstrada na família Moraceae. Estudos de identificação e quantificação de furanocumarinas em "carapiá" (espécies de *Dorstenia*, Moraceae) são

realizados, atualmente, no Brasil, por causa de suas propriedades medicinais contra doenças de pele (CARDOSO e colaboradores, 1999).

### 3.3.1 Aspectos fitoquímicos do gênero *Dorstenia*

De acordo com ABEGAZ e colaboradores (2002), o gênero *Dorstenia* é reconhecido como uma rica fonte de cumarinas prenil e geranil substituídas, chalconas, flavonas e flavanonas.

#### 3.3.1.1 Cumarinas, triterpenos e esteróides

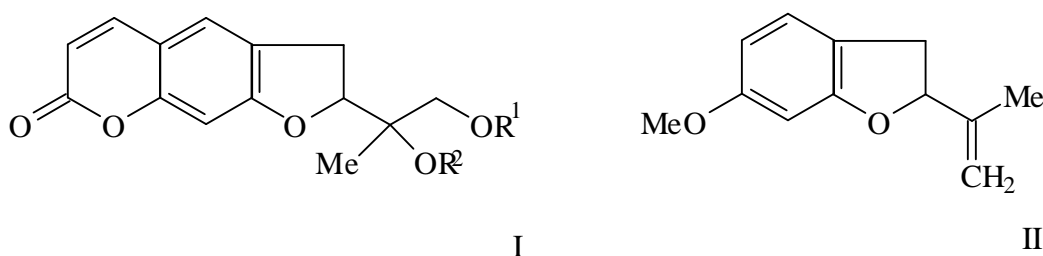
BAUER e NOLL (1986) isolaram e identificaram, dos extratos etéreo e alcoólico dos rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam., duas furanocumarinas lineares: psoraleno (0,28%) e bergapteno (0,08%), que são substâncias fotossensibilizantes.

Por meio do fracionamento inicial do extrato etanólico dos rizomas de *Dorstenia heringeri* Car. & Val. (Moraceae), VILEGAS e colaboradores (1992) separaram ácidos graxos, furanocumarinas simples e uma furanocumarina monoterpênica.

Triterpenos pentacíclicos, esteróides e furanocumarinas foram identificados nas frações hexânicas dos rizomas ou folhas de cinco espécies de *Dorstenia* (Moraceae) (*D. bahiensis* Kl., *D. bryoniifolia* Mart ex. Miq., *D. carautae* C.C.Berg, *D. cayapiaa* Vell. e *D. heringerii* Car. & Val). Os compostos terpenóides isolados têm sido relatados como os responsáveis pelo uso popular de espécies de *Dorstenia* como antiofídicos (VILEGAS e colaboradores, 1997).

TOVAR-MIRANDA e colaboradores (1998) isolaram e identificaram, das raízes de *Dorstenia contrajerva*, a dihidrofuranocumarina (2S\*,1'S\*)-2,3-dihidro-2-(1'-hidroxi-1'-acetiloximetiletil)-7H-furo[3,2-g][1]benzopirano-7-ona, cuja estrutura encontra-se representada abaixo.

FIGURA 1 – DIHIDROFURANOCUMARINA DE *Dorstenia contrajerva*



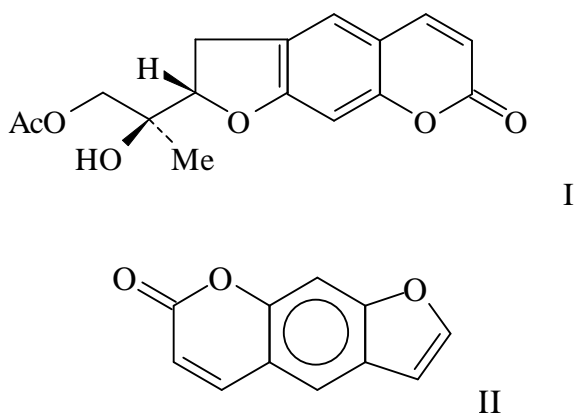
Três derivados fenilpropanóides conhecidos, estearil-p-cumarato [octadecanil-3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoato], estearil-ferulato [octadecanil-3-(4-hidroxí-3-metoxifenil)prop-2-enoato] e psoraleno foram isolados a partir de *Dorstenia psilurus* (NGADJUI e colaboradores, 1998).

O triterpeno butirospermol foi isolado de extratos de *Dorstenia poinsettifolia* (TSOPMO e colaboradores, 1998).

CARDOSO e colaboradores (1999) determinaram a presença de furanocumarinas (psoraleno, bergapteno, pimpinelina e isopimpinelina) nos rizomas e partes aéreas de *Dorstenia tubicina*, *Dorstenia asaroides* e *Dorstenia vitifolia*, e em amostras comerciais.

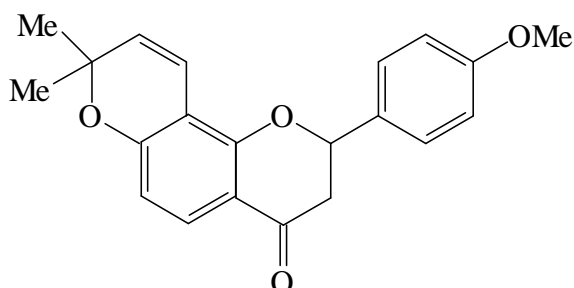
Estudos fitoquímicos das raízes de *Dorstenia excentrica* levaram ao isolamento e identificação de furanocumarinas, a saber, um diastereoisômero do prandiol (figura 2-I), com a configuração 2'S,1''S; 4-[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butoxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopirano-7-ona; 7H-furo[3,2-g][1]benzopirano-7-ona (psoraleno – figura 2-II) e 7-hidroxi-cumarina. As furanocumarinas 7 - hidroxi-cumarina, psoraleno e o dímero do psoraleno também foram isolados de *D. lindeniana*, enquanto 5-[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butoxil]-7H-[3,2-g][1] benzopirano - 7 - ona e bergapteno estão presentes nas raízes de *D. drakena* (ROJAS-LIMA e colaboradores, 1999).

FIGURA 2 – DIASTEREOISÔMERO DO PRANDIOL PRESENTE EM *Dorstenia excentrica*



NGADJUI e colaboradores (1999) isolaram e identificaram, dos brotos de *Dorstenia poinsettifolia*, poinsettifolactona (figura 3) - uma nova dihidro-4-prenilcumarina -, além de uma rara dihidrocumarina 4-fosfo-substituída.

FIGURA 3 – CUMARINA PRESENTE EM *Dorstenia poinsettifolia*

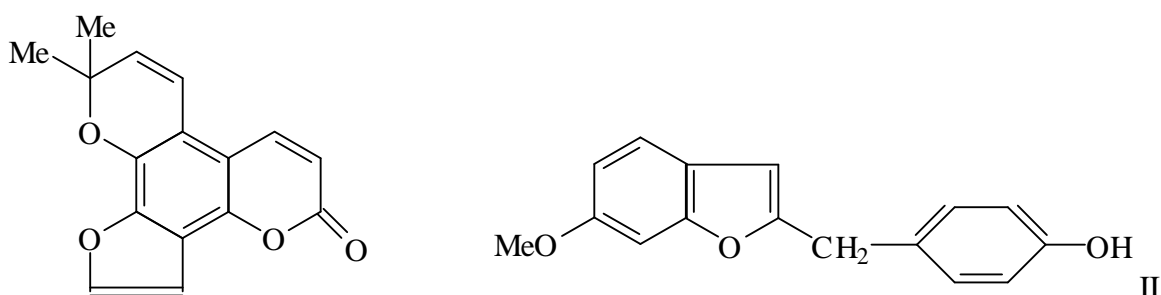


Furanocumarinas geranil substituídas têm sido identificadas em muitas espécies do gênero *Dorstenia* (ABEGAZ e colaboradores, 2002).

Uma nova furanocumarina glicosilada,  $\alpha$ -l-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glucopiranosil-bergaptol (1), foi isolada de *Dorstenia contrajerva*, juntamente com três furanocumarinas conhecidas, catequina e epicatequina (CACERES e colaboradores, 2001).

FRANKE e colaboradores (2001) isolaram uma série de furanocumarinas preniladas, lineares e angulares (ex., dorstegina – figura 3-I), e um derivado benzofurano (figura 3-II) das folhas e brotos de *Dorstenia gigas* (Moraceae), planta de ocorrência endêmica na ilha de Socotra (Yemen).

FIGURA 3 – FURANOCUMARINAS DE *Dorstenia gigas*





7H-furo (3,2-g) (1) benzopirano-7-ona, de espécies de *Dorstenia* (Moraceae). Dorstenina apresentou propriedades fotossensibilizantes e mutacionais frente a cepas selvagens de *E. coli* e *S. cerevisiae*, porém, com menor efeito genotóxico, comparado às altas atividades do psoraleno e bergapteno.

CARDOSO e colaboradores (2002) apresentam análises da composição química em furanocumarinas do infuso e decocto de "Carapiá" (espécies de *Dorstenia*), que são utilizadas no Brasil contra várias doenças. De acordo com esses autores, o conteúdo em furanocumarinas revelou uma diferença insignificante entre infuso e decocto. *Dorstenia tubicina* e *D. asaroides* apresentaram psoraleno e bergapteno somente nos rizomas, enquanto *D. vitifolia* apresentou isopimpinellina em ambos, rizomas e partes aéreas.

*D. prorepens* apresentou os compostos conhecidos: psoraleno, bergapteno, beta-sitosterol e seus derivados D-glucopiranosídicos (ABEGAZ e colaboradores, 2002).

UCHIYAMA e colaboradores (2002) isolaram e identificaram dois triterpenóides, ácido dorstênico A e B, além de um diterpenóide já conhecido (tipo isopimarane) e seis cumarinas, das raízes de *Dorstenia brasiliensis*. Os dois triterpenóides apresentaram citotoxicidade moderada contra células leucêmicas (L-1210 e HL-60).

### 3.3.1.2 Flavonóides

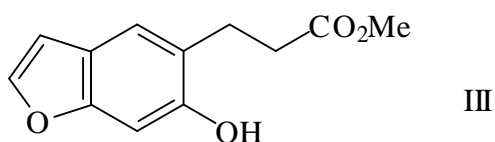
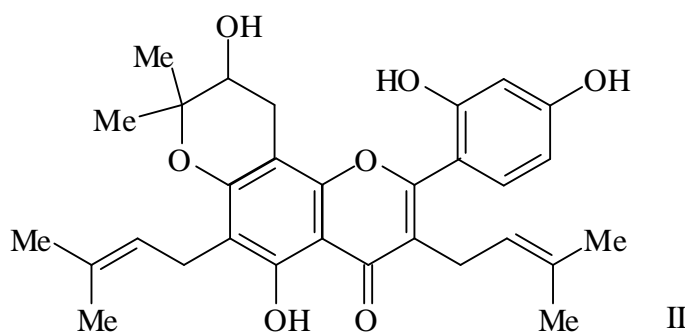
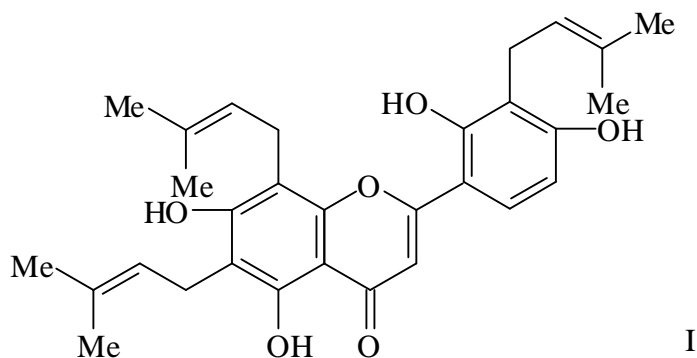
Foram isolados e identificados, dos brotos de *Dorstenia manii*, três flavonóides prenilados e um geranilado: 3',4'-(2,2-dimetilcromano)-2',4'-dihidroxichalcona (dorsmanin A); bis(2,2-dimetilcromano)flavanona (dorsmanin B); 7,8-(2,2-dimetilcromeno)-6-geranil-3,5,3',4'-tetrahidroxiflavonol (dorsmanin C) e 6,8-bis(3,3-dimetilalil)-3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavonol (dorsmanin D). Também foram identificados os flavonóides conhecidos: 3',4'-(2,2-dimetilcromeno)-2',4'-dihidroxichalcona; 6-(3,3-dimetilalil)-5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona e 6,8-bis(3,3-dimetilalil)-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (canflavin B) (NGADJUI e colaboradores, 1998).

Dois novos flavonóides: 6,7-(2,2-dimetilcromano)-5,4'-dihidroxiflavona e 3,4,4',5'-bis-(2,2-dimetilcromano)-2'-hidroxichalcona, juntamente com o já conhecido 6-(3-metilbut-2-enil)apigenina, e duas chalconas, (E)-1-[2,4-dihidroxi-

3-[3-metilbut-2-enil]fenil]-3-[4-hidroxifenil]-prop-2-en-1-ona e (E)-1-[2,4-dihidroxi-5-[3-metilbut-2-enil]-fenil]-3-[4-hidroxi-3-[3-metilbut-2-enil]fenil]-prop-2-en-1-ona foram caracterizados a partir do tecido foliar de *Dorstenia kameruniana* (ABEGAZ e colaboradores, 1998).

NGADJUI e colaboradores (1998) isolaram e caracterizaram, de *Dorstenia psilurus*, duas novas flavonas, dorsilurins A (figura 4-I) e B (figura 4-II), e um novo derivado benzofurano (figura 4-III).

FIGURA 4 – FLAVONAS E DERIVADO BENZOFURANO DE *Dorstenia psilurus*

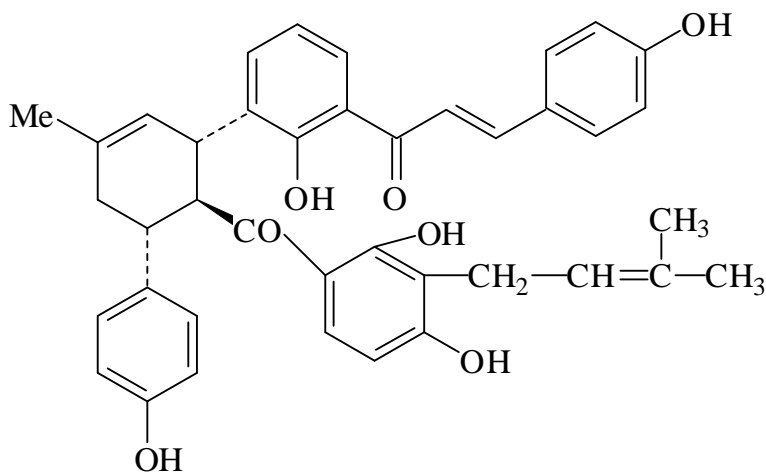


Dois novos flavonóides geranilados, “poinsettifolins” A e B, foram isolados de extratos de *Dorstenia poinsettifolia*. Também foram isolados a flavona 5,7,4-trihidroxi-8-prenilflavona (licoflavona C), as chalconas 4,2',4'-trihidroxi-3'-prenilchalcona (isobavachalcona) e isobavacromeno, e o carotenóide luteína (TSOPMO e colaboradores, 1998).

A investigação dos brotos de *Dorstenia mannii* forneceu 6,8-diprenil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona, e quatro novas flavanonas preniladas, denominadas “dorsmanins” E-H e caracterizadas como 5,6-7,8-bis-(2,2-dimetilcromano)-3',4'-dihidroxiflavanona; 7,8-[2''-(1 - hidroxi -1-metiletil)-dihidrofurano] - 6 - prenil - 5,3',4'-trihidroxiflavanona; 6,7 - [2''-(1 - hidroxi - 1 - metiletil)dihidro-furano] - 8 - prenil - 5,3',4'-trihidroxiflavanona, e 6-prenil-8-(2-hidroxi-3-metilbut - 3 - enil) - 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona, respectivamente (NGADJUI e colaboradores, 1999).

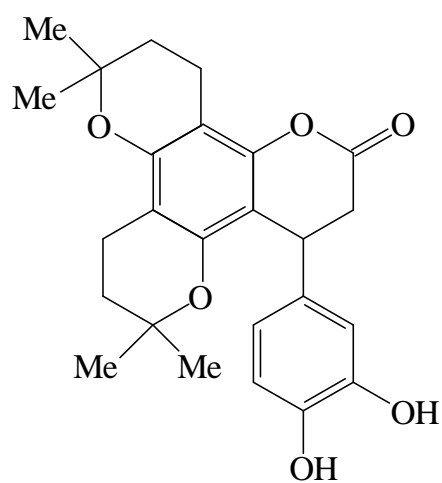
Um novo flavonóide, “dorstenona” (figura-5), foi isolado de *Dorstenia barteri*, juntamente com três flavonóides conhecidos, 4,2',4'-trihidroxi-3'-prenilchalcona; 4,2',4'-trihidroxi-3,3'-diprenilchalcona, e 5,7,4'-trihidroxi-8-prenilflavona (TSOPMO e colaboradores, 1999).

FIGURA 5 – FLAVONÓIDE DE *Dorstenia barteri*



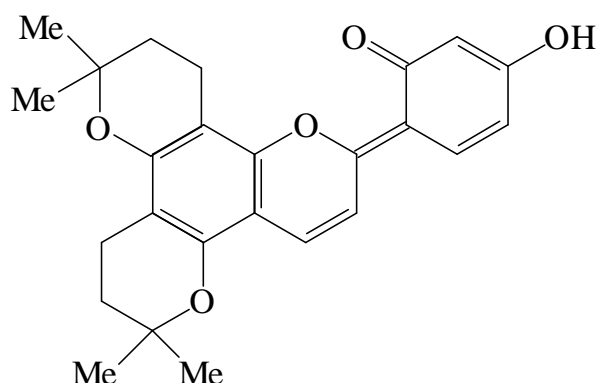
Foram isolados e identificados, dos brotos de *Dorstenia poinsettifolia*, “dorspoinsettifolin” (figura 6), uma nova 7,8-(2,2-dimetilpirano) - 4' - metoxiflavanona, além de três flavonóides prenilados conhecidos, 4 - hidroxiloncocarpin, 4 - metoxi-loncocarpin e 4'-hidroxiisoloncocarpin, além de raras chalconas geranil e prenil substituídas (NGADJUI e colaboradores, 1999).

FIGURA 6 – FLAVONÓIDE PRENILADO DE *Dorstenia poinsettifolia*

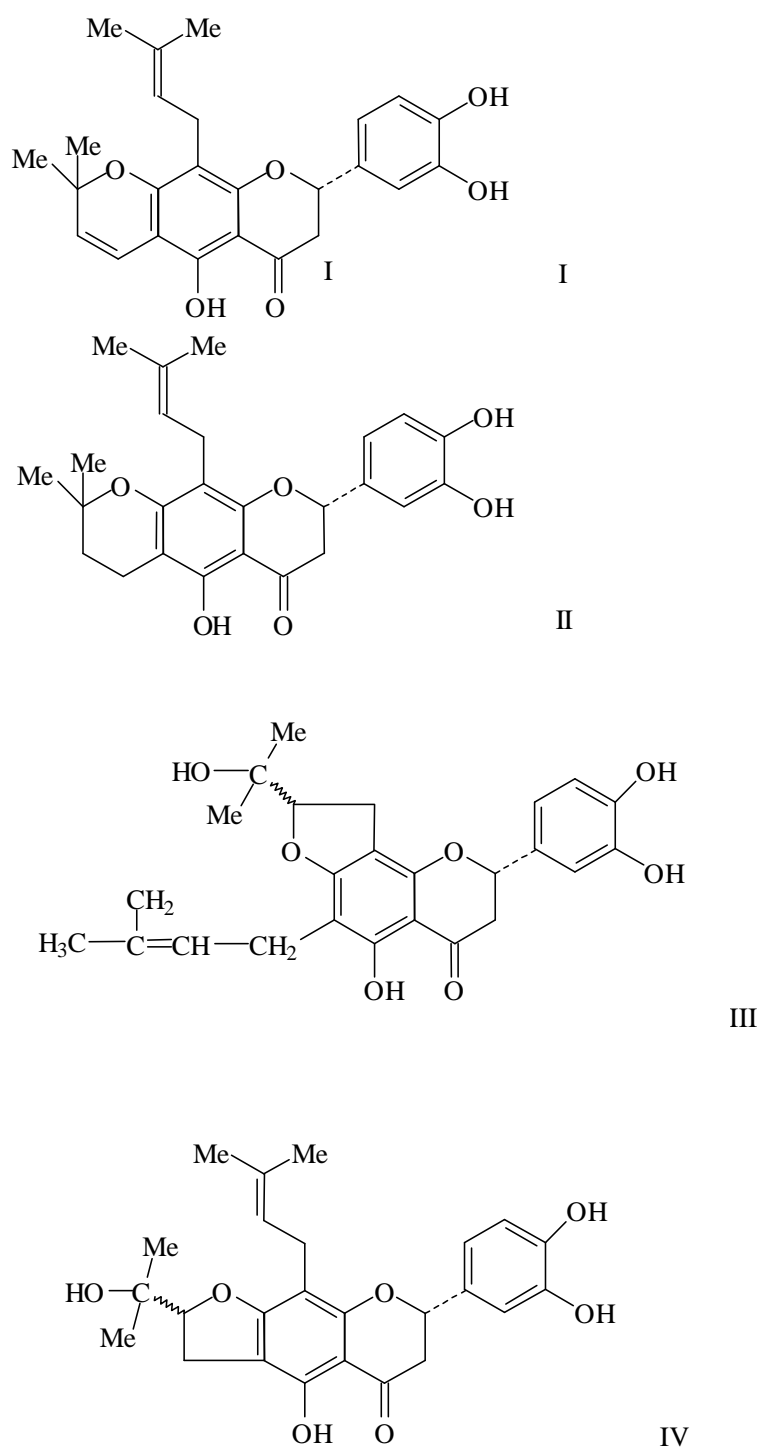


NGADJUI e colaboradores (1999) isolaram e identificaram, das raízes de *Dorstenia psilurus*, três compostos fenólicos: 6,8-diprenil-3'[O],4'-(2,2-dimetilpirano)-3,5,7-trihidroxiflavona; 3,6-diprenil-8-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)-5,7,2',4'-tetrahidroxiflavona, e um raro derivado flavonóide (figura 7) com modificação nos anéis B e C, denominados respectivamente de dorsilurins C, D e E.

FIGURA 7 – FLAVONÓIDE PRENILADO DE *Dorstenia psilurus*



Quatro novas flavanonas preniladas, dorsmanins I (figura 8-I) e J (figura 8-II), e epi-dorsmanins F (figura 8-III) e G (figura 8-IV), identificados, respectivamente como 6,7-(2,2-dimetilpirano)-8-prenil-5,3',4'-trihidroxiflavanona; 6,7-(2,2-dimetildihidropirano)-8-prenil-5,3',4'-trihidroxiflavanona e 2''-epímeros de "dorsmanins" F e G foram isolados das partes aéreas de *Dorstenia manii*, juntamente com 13 flavonóides conhecidos: 4-hidroxiloncocarpina; 4-metoxiloncocarpina; 6-prenilcrisoeriol; 6,8-diprenileriodictiol; gancaonin P e "dorsmanins" A-H (NGADJUI e colaboradores, 2000).

FIGURA 8 – FLAVONÓIDES PRENILADOS DE *Dorstenia mannii*

*D. mannii* forneceu um derivado geranil, oito flavanonas dipreniladas e um flavonol. *D. psilurus* forneceu todos os compostos triprenilados encontrados no gênero *Dorstenia* e um destes compostos é o único a apresentar o anel B, da estrutura dos flavonóides, modificado para uma dienona. O flavonóide 4-hidroxi-loncocarpina foi encontrado em *Dorstenia prorepens* e *Dorstenia zenkeri*. Flavonóides prenillados têm sido amplamente relatados somente em espécies africanas de *Dorstenia* (ABEGAZ e colaboradores, 2002).

Os brotos de *Dorstenia prorepens* forneceram a chalcona digeranilada, 5,3'-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona, sendo o único exemplo de uma chalcona digeranilada encontrado na literatura. *Dorstenia zenkeri* forneceu a 3',4'-(3-hidroxi-2,2-dimetilhidropirano)-4,2'-dihidroxichalcona; 4,2',4'-trihidroxichalcona; 4,2',4'-trihidroxi-3'-prenilchalcona, e uma bichalcona, além dos compostos p-hidroxibenzaldeído e dorsmanin A. Uma nova chalcona, 6-prenilcrisoeriol (22 R = Ome) foi obtida a partir de *D. mannii* (ABEGAZ e colaboradores, 2002).

Três flavonóides prenillados, dinklagins A, B e C, identificados respectivamente como (-)-6-(3,3-dimetilalil)-7-dihidroxi-6'', 6''-dimetilcromeno-(4',3',2'',3'')-flavanona; (+)-5,4',5''xi-trihidroxi-6'',6''-dimetilcromano-(7,6,2'',3'')-flavona e (+)6-(2xi-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5,7,4'-trihidroxiflavona foram isolados dos brotos de *Dorstenia dinklagei*, juntamente com os compostos já conhecidos 6-prenilapigenina; 4-hidroxi-loncocarpina; estipulina e 5,4'-dihidroxi-6'',6''-dimetilcromano-(7,6,2'',3'')-flavona (NGADJUI e colaboradores, 2002).

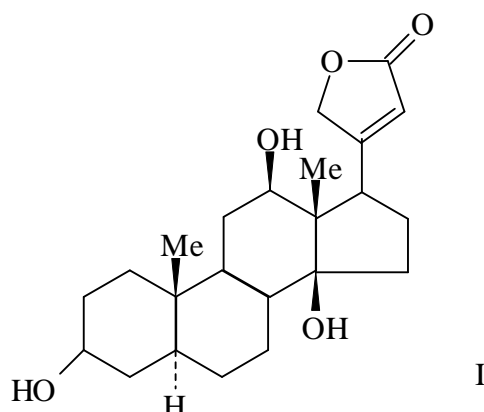
### 3.3.1.3 Estirenos

WOLDU e colaboradores (1988) isolaram três novos estirenos de *D. barnimiana* (Moraceae), os quais foram identificados como: 6-metoxi-5-vinilbenzofurano; 4,6-dimetoxi-5-vinilbenzofurano e 2,4-dimetoxiestireno.

Os primeiros exemplos de ocorrência natural de estirenos foram identificados em *D. barnimiana* (ABEGAZ e colaboradores, 2002).

CASAGRANDE e colaboradores (1974) determinaram a estrutura da siriogenina (figura 9), isolada de *Dorstenia contrajerva*.

FIGURA 9 – ESTRUTURA DA SIRIOGENINA



### 3.3.2 Aspectos farmacológicos do gênero *Dorstenia*

Os dados farmacológicos sobre o gênero *Dorstenia* são escassos, mas sabe-se que todas as espécies do gênero conhecidas como carapiá são dotadas de qualidades medicinais (FLORA BRASILEIRA, 1983).

Extratos de 87 espécies, pertencentes a 8 gêneros da família Moraceae, foram avaliados para constituintes fototóxicos, utilizando a bactéria gram-negativa *E. coli*. Somente 2 das 72 espécies do gênero *Ficus* testadas foram positivas para metabólitos fototóxicos. Em contraste, todas as espécies testadas do gênero *Dorstenia* (5 espécies) e *Fatoua* (1 espécie) apresentaram graus variados de atividade antimicrobiana ativada pela luz. Extratos das raízes apresentaram compostos fotossensibilizantes mais potentes, ou maiores concentrações de fototoxinas, em comparação aos extratos de folhas ou flores. Furanocumarinas (5-metoxipsoraleno e psoraleno) foram identificados nos extratos de todas as espécies que apresentaram fototoxinas (SWAIN e DOWNUM, 1990).

De acordo com RUPPELT e colaboradores (1991), a infusão a 10% (planta seca) e 20% (planta fresca), correspondendo a 1 e 2 g/kg, respectivamente, de *Dorstenia brasiliensis*, demonstrou atividade analgésica e/ou anti-inflamatória, por administração oral.



O extrato metanólico de *Dorstenia multiradiata*, utilizada na medicina tradicional nigeriana, foi ativo, em concentrações de 50 microgramas/mL ou menos, contra a *Leishmania visceral* isolada (IWU e colaboradores, 1992).

Compostos terpenóides têm sido relatados como os responsáveis pelo uso popular de espécies de *Dorstenia* como antiofídicos (VILEGAS e colaboradores, 1997).

Extratos de *D. multiradiata* apresentaram atividade antileishmanial. Extratos e/ou compostos de outras espécies apresentaram atividades anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e citotóxica (ABEGAZ e colaboradores, 2002).

De acordo com DIMO e colaboradores (2001), o extrato metanólico de *Dorstenia psilurus* apresentou efeitos antihipertensivos em ratos hiperinsulinêmicos e hipertensos, alimentados com frutose. Além disso, observou-se diminuição nos níveis de colesterol e insulina.

O uso de furanocumarinas, que possuem propriedades fotossensibilizantes, combinado com exposição à radiação UV-A, constitui um tratamento comum para vitiligo, psoríase e outras doenças de pele. Deve-se ressaltar, no entanto, que, apesar dos benefícios, altas doses de furanocumarinas aumentam o risco de desenvolvimento de carcinomas cutâneos. As espécies de *Dorstenia* que são utilizadas no Brasil apresentam doses consideráveis de furanocumarinas (CARDOSO e colaboradores, 2002).

### 3.3.3 Aspectos toxicológicos do gênero *Dorstenia*

Além das propriedades medicinais, as espécies do gênero *Dorstenia* conhecidas como carapiá apresentam alguns princípios tóxicos. Talvez este fato justifique a repulsa dos animais herbívoros por estas plantas (FLORA BRASILEIRA, 1983).

## 3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Dorstenia multiformis*, MIQUEL

### 3.4.1 Sinonímia vulgar

Segundo COIMBRA (1942), *Dorstenia multiformis* possui vários nomes populares, alguns dos quais são utilizados comercialmente: caapiá, caiapiá, carapá, carapiá, conta de cobra, contra herva, liga osso, taporé e tiú.

De acordo com a FLORA BRASILEIRA (1983), pode-se citar como sinônimos populares: caiapiá-do-grande, capa-homem, carapiá e contra-veneno.

CRUZ (1995) apresenta os seguintes nomes vulgares para a espécie: caapiá, caiapiá, carapá, carapiá, capiá, contraerva e liga osso.

COIMBRA (1942) cita alguns sinônimos estrangeiros, a saber, contrayerba (espanhol), contraierva (italiano), contrayerve (francês), widergift, peruvianische e gilfwurzel (alemão).

#### 3.4.2 Sinonímia científica

Segundo MISSOURI BOTANIC GARDEN (2004)

A espécie *Dorstenia multiformis* também pode ser citada como: *Dorstenia multiformis* var. *arifolia*, *Dorstenia multiformis* var. *ceratosanthes*, *Dorstenia multiformis* var. *ficifolia*, *Dorstenia multiformis* var. *ramosa*.

#### 3.4.3 Distribuição geográfica

Essa espécie vegetal é originária do Brasil, habitando em São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais (CRUZ, 1995). Nasce espontaneamente no Estado de São Paulo, mais precisamente na Serra do Mar, onde aparece com frequência. Planta silvestre, muito resistente às queimadas e secas (FLORA BRASILEIRA, 1983).

#### 3.4.4 Usos populares

A espécie *Dorstenia multiformis* encontra várias aplicações terapêuticas e usos populares, porém sem comprovação científica. É uma planta brasileira conhecida por suas propriedades medicinais (FLORA BRASILEIRA, 1983), sendo estas especialmente vinculadas às suas raízes (CRUZ, 1995).

Possui importância medicinal como tônica, estimulante, diaforética (sudorípara), diurética, emenagoga (COIMBRA, 1942; FLORA BRASILEIRA, 1983) e anti-febril, e em associação com o taiuiá, na forma de tintura, apresentando excelentes resultados na reparação de fraturas dos ossos (CRUZ, 1995).

Dessa forma, a planta é preconizada para combater a prisão de ventre, perturbações do estômago, gastrite, anemia, clorose, febres tifóides, desarranjos do útero, supressão das regras, diarréias, disenterias, febres intermitentes, afecções do aparelho respiratório, cistites etc (CRUZ, 1995).

Popularmente, é utilizada na anemia, na atonia do aparelho digestivo, nas diarréias, nas febres tifóides e nas menstruações doloridas e tardias (COIMBRA, 1942; FLORA BRASILEIRA, 1983). Além disso, aumenta o volume da urina, tornando-a clara (COIMBRA, 1942).

Os rizomas de *Dorstenia multiformis*, associados ao taiuiá, são usados empiricamente em nosso país, para a reparação de fraturas dos ossos, na forma de cozimento (CRUZ, 1995). Os sertanejos usam a massa do rizoma em cataplasmas, com essa mesma finalidade, e consideram-no antídoto contra o veneno de cobras (COIMBRA, 1942).

Suas raízes e rizomas também são considerados antifebris, diaforéticos e expectorantes (FLORA BRASILEIRA, 1983).

As formas farmacêuticas habituais são: infuso, decocto, extrato fluido, pó, tintura, elixir, vinho, xarope (COIMBRA, 1942) e cápsulas.

#### 3.4.5 Descrição botânica de *Dorstenia multiformis*

A espécie *Dorstenia multiformis* apresenta-se como uma planta herbácea, de rizoma carnoso e ramificado, com caule curto, rasteiro e mais ou menos subterrâneo. As folhas são longo-pecioladas, oblongas ou ovaladas, divididas em vários lobos, inteiras ou pinatífidas, verde-escuras na parte superior e pálidas na inferior. Apresenta flores de tamanho bastante reduzido e frutos do tipo castanha (FLORA BRASILEIRA, 1983).

Segundo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1926), o rizoma de *Dorstenia multiformis*, parte usada, apresenta-se macroscopicamente de forma cilíndrica,

irregular, tortuoso, mais dilatado na parte inferior e medindo de 5 a 10cm de comprimento por 10 a 20mm de largura (figura 10).

Em quase toda a sua extensão, apresenta numerosas brácteas foliáceas lanceoladas, de 4 a 6mm de comprimento, e algumas cicatrizes oval-triangulares, salientes, produzidas pela queda dos pecíolos; bem como numerosas radículas delgadas e longas.

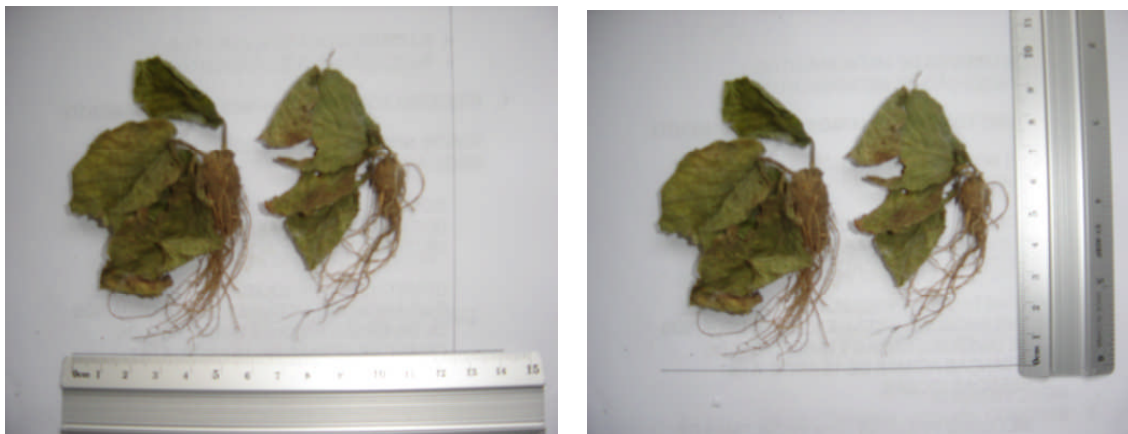
Sua coloração apresenta-se como pardo-esverdeada e possui cheiro aromático agradável, semelhante ao do figo, e sabor que, de pouco pronunciado, torna-se acre.

Sua estrutura microscópica apresenta alguns pêlos tectores cônicos, unicelulares, e pêlos glandulosos, pediculados, capitados, pluricelulares. O lenho é representado por feixes fibro-vasculares, bastante largos e curtos, constituídos por numerosos vasos, que são dispostos em filas radiais separadas por algumas células de paredes pouco espessas (separadas entre si por largos raios medulares), e recobertos exteriormente por um líber desprovido de fibras esclerenquimáticas.

FIGURA 10 – A ESPÉCIE *Dorstenia multiformis*, MIQUEL, MOSTRANDO AS RAÍZES E PARTES AÉREAS



FIGURA 11 – A ESPÉCIE *Dorstenia multiformis*, MIQUEL, MOSTRANDO DIMENSÕES DAS RAÍZES E PARTES AÉREAS



#### 3.4.6 Aspectos fitoquímicos de *Dorstenia multiformis*

Segundo COIMBRA (1942), os principais constituintes químicos encontrados em *Dorstenia multiformis* são dorstenina, ácido dorstênico, óleo essencial, sais e matérias gordurosas e pépticas etc.

BARBOSA (2000), em “screening” fitoquímico, detectou a presença dos seguintes grupos químicos: glicosídeos flavônicos, aminogrupos e cumarinas, no extrato hidroalcoólico, e ácidos fixos, ácidos voláteis, taninos condensados e aminogrupos, no extrato aquoso.

#### 3.4.7 Aspectos toxicológicos de *Dorstenia multiformis*

O uso do carapiá, em doses inadequadas, pode causar sérios transtornos ao ser humano, como intoxicação na forma de vômitos, intenso ardor no estômago, disenterias e ulcerações na mucosa (FLORA BRASILEIRA, 1983).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A espécie *Dorstenia multiformis* foi fornecida pela indústria farmacêutica "As Ervas Curam", em março de 2004. A coleta foi efetuada na Fazenda Capão Grande, situada no município de Jataí, estado de Goiás, em janeiro de 2004. O material enviado consistia em todas as partes da planta, secas, estabilizadas e moídas.

Uma amostra da planta inteira foi enviada ao Museu Botânico Municipal de Curitiba, para identificação botânica, e encontra-se registrada neste museu sob o número 37440.

### 4.2 CONSERVAÇÃO

Até o momento do uso, o material foi mantido em saco de papel, devidamente fechado e identificado, ao abrigo da luz e da umidade.

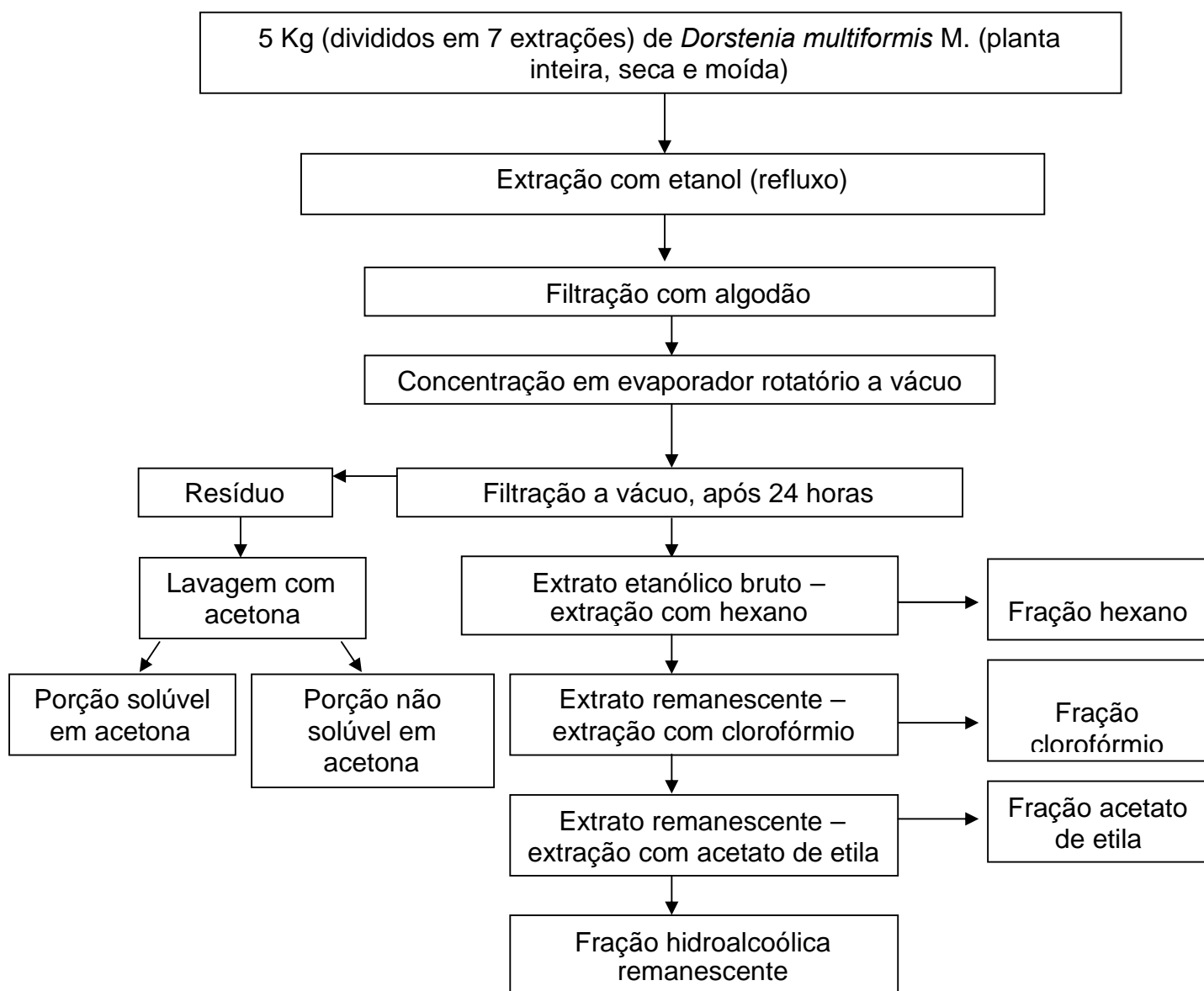
### 4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

Foram submetidos 5Kg do material vegetal (conforme descrito anteriormente) à extração por refluxo, com etanol absoluto, em aparelho de soxhlet. O extrato obtido foi filtrado com algodão e concentrado em evaporador rotatório Laborota<sup>®</sup>, sob pressão reduzida, com aquecimento em banho-maria a temperatura de, aproximadamente, 40°C, sendo, em seguida, armazenado em frascos âmbar. Após 24 horas, o extrato concentrado foi filtrado a vácuo, obtendo-se o extrato etanólico bruto e o resíduo correspondente, os quais foram armazenados separadamente em frascos âmbar.

O extrato bruto etanólico foi fracionado, por meio de partição líquido-líquido em aparelho de soxhlet modificado (CARVALHO, 2001), utilizando-se solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Esse procedimento resultou nas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

O resíduo resultante da filtração do extrato concentrado foi lavado com acetona, obtendo-se as porções solúvel em acetona (I) e não solúvel em acetona (II).

FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E O RESÍDUO RESULTANTE



#### 4.4 ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS

As análises organolépticas consistiram na avaliação dos parâmetros de cor, odor, sabor e pH do extrato etanólico bruto, utilizando-se dos sentidos da visão, olfato e paladar, e do aparelho de medição pHmetro.

#### 4.5 TEOR DE SÓLIDOS

Consiste na determinação da quantidade de matéria sólida presente em 1mL de amostra.

Para essa análise, utilizou-se técnica adaptada de MIGUEL (2003), onde três cadinhos de porcelana foram previamente secos em estufa e pesados (após esses procedimentos, os cadinhos foram manipulados com auxílio de pinça metálica, sem contato manual). Em seguida, adicionou-se, em cada cadinho, 1mL da amostra e levou-se à estufa a 100°C. Foram realizadas pesagens a cada hora, até obter-se um valor constante de peso, para cada cadinho.

O resultado consiste na média dos três valores finais de peso da matéria seca, e é apresentado em forma de porcentagem.

A determinação do teor de sólidos foi realizada para o extrato etanólico bruto e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila.

#### 4.6 PESQUISA DE GRUPOS FITOQUÍMICOS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, há necessidade de uma abordagem química, isto é, um exame rápido e superficial, que forneça uma visão geral da composição química da droga ou da planta, indicando os



grupos de metabólitos secundários relevantes da mesma; isto é feito por meio da análise fitoquímica preliminar (MATOS; MATOS, 1989; SIMÕES e colaboradores, 2000).

Nesse contexto, para direcionar o estudo químico, realizou-se a identificação dos principais grupos químicos presentes na espécie *Dorstenia multiformis*, utilizando-se as metodologias descritas por MOREIRA (1979), MATOS e MATOS (1989) e MIGUEL (2003) com algumas adaptações. De acordo com essa metodologia, são utilizados os extratos alcoólico a 20% e aquoso, e suas respectivas frações, para as determinações fitoquímicas.

#### 4.6.1 Extrato alcoólico 20%

Para o preparo do extrato alcoólico a 20%, pesou-se 40g do material vegetal seco e moído, e adicionou-se 200mL de etanol 70%, que corresponde ao líquido extrator. O material foi levado ao banho-maria por 1 hora a 70°C, em frasco aberto. Após esse período, foi filtrado em algodão e o volume completado para 200mL com o líquido extrator.

A partir do extrato hidroalcoólico assim obtido, foi realizado o fracionamento, segundo um gradiente de polaridade. Os solventes utilizados foram: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

Para esse procedimento, o extrato foi concentrado até aproximadamente 1/3 do volume inicial, com o intuito de eliminar o excesso de etanol. Em funil de separação, foram utilizadas cinco alíquotas de 20mL para cada solvente e agitados. A fração final foi recolhida e chamada de fração hidroalcoólica remanescente. Cada fração obtida foi completada para 200mL com o respectivo líquido extrator (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol) e armazenada em frasco âmbar, em geladeira.

Obteve-se assim as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, que foram utilizadas para pesquisa de alcalóides, leucoantocianidinas, flavonóides, cumarinas, antraquinonas, esteróides e triterpenos.

##### 4.6.1.1 Pesquisa de alcalóides

Os alcalóides são compostos de caráter básico e sua solubilidade em diferentes reagentes, modifica em função do pH. Os alcalóides na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes aquosos; na forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos (DIAS, 2005).

Esta pesquisa fundamenta-se na capacidade que os alcalóides possuem, em estado de sal, de combinar-se com iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio e formarem precipitados (DIAS, 2005).

Dessa forma, a determinação qualitativa de alcalóides é feita com a utilização de reativos considerados gerais para alcalóides: solução de iodo-iodeto de potássio (Reativo de Wagner), mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), solução de ácido pícrico (Reativo de Hager), ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand), p-dimetilamino benzaldeído (Reativo de Ehrlich) e Reativo de Vitali-Morin (promove a nitração de alcalóides).

Uma alíquota de 50mL de cada fração obtida pelo processo descrito anteriormente foi evaporada em banho-maria a 50°C. O resíduo foi dissolvido em 1ml de etanol e acrescido de 20mL de HCl 1%. Utilizou-se 5 tubos de ensaio para cada amostra testada, sendo transferidos 1ml do respectivo extrato clorídrico em cada tubo, para a pesquisa de alcalóides com os reativos citados (2 gotas para cada reativo). Considera-se positiva a presença de alcalóides na amostra com as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat:: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Para cada amostra, utilizou-se um tubo somente com o extrato clorídrico, servindo como controle negativo.

#### 4.6.1.2 Pesquisa de Flavonóides

Flavonóides são compostos cuja estrutura se baseia num esqueleto carbônico  $C_6-C_3-C_6$ , com um anel cromano ostentando um segundo anel aromático na posição 2. As principais categorias estruturais gerais são

flavonas, flavanonas, flavonóis, antocianidinas e isoflavonas. Em alguns casos, o anel heterocíclico de seis membros é substituído por um anel de cinco membros (auronas) ou aparece em uma forma isomérica de cadeia aberta (chalconas). Os flavonóides também são encontrados na forma de derivados glicosilados, metilados, acilados, prenilados ou sulfatados (ROBERS e colaboradores, 1997).

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura dos flavonóides em presença de ácido.

#### 4.6.1.2.1 Leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonóides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Esta pesquisa explica-se com a reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina (de coloração vermelha) em presença de ácido clorídrico (DIAS, 2005).

Foram levados à secura 10mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, em banho-maria (50°C), retomados em 5mL de etanol e adicionadas 5 gotas de HCl concentrado. Levou-se à ebulição. A reação é positiva com o desenvolvimento de coloração vermelha.

#### 4.6.1.2.2 Heterosídeos Flavônicos

Levou-se à secura em banho-maria (50°C) 10mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, adicionou-se 5mL de etanol e transferiu-se para tubos de ensaio. A fração hidroalcoólica não foi levada à secura, apenas transferida diretamente (5mL) para um tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200mg de limalha de ferro e HCl fumegante (lentamente). Reação positiva com desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

#### 4.6.1.2.3 Flavonóis

A presença de flavonóis foi verificada por meio do teste do oxalo-bórico ou reação de Taubock. A reação pode ser explicada pela formação de

quelatos, produzindo um deslocamento batocrômico na banda I dos derivados do ácido borínico, que são compostos obtidos do ácido bórico, com substituições na molécula por dois radicais orgânicos. A reação oxalo-bórica, em particular dos flavonóides (flavonóis), determina o aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada, enquanto as flavanonas e isoflavonas não acusam esta propriedade e os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência (MOREIRA, 1979).

Foram transferidos 10mL de cada fração para um bécker e levados à secura. Adicionou-se 5 gotas de acetona e 30mg da mistura ácido bórico e ácido oxálico, na proporção 1:1, levando novamente à secura. Ao resíduo, adicionou-se 5mL de éter etílico. A visualização foi realizada com observação no ultravioleta, em tubo de ensaio.

#### 4.6.1.2.4 Dihidroflavonóides

Em cápsulas de porcelana, foram adicionados 10mL de cada fração e levados à secura em banho-maria. Em seguida, levou-se ao fogareiro, adicionando cristais de acetato de sódio, 0,1ml de anidrido acético e 0,1mL de HCl concentrado. A reação é considerada positiva com o desenvolvimento de coloração roxa.

#### 4.6.1.2.5 Dihidroflavonóis

As frações dissolvidas em 5mL de etanol (conforme descrito anteriormente) foram acrescidas de uma pastilha de zinco e HCl fumegante (lentamente), mantendo o recipiente em banho de gelo (reação exotérmica) e dentro da capela. A reação positiva é observada com o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

#### 4.6.1.3 Pesquisa de Cumarinas

Cumarinas são lactonas derivadas dos ácidos *p*-hidrocinâmicos que sofrem *orto*-hidroxilação e depois fechamento do anel situado entre o grupo *orto*-hidroxila e o grupo carboxila de cadeia lateral, seguido de isomerização

*trans* para *cis* da ligação dupla de cadeia lateral. Quando isoladas, aparecem na forma de cristais prismáticos, incolores, com odor e sabor amargo (ROBBERS e colaboradores, 1997).

As cumarinas são derivados da 5,6-benzo-2-pirona ( $\alpha$ -cromona). Originam-se do ácido *trans*-cinâmico que, por oxidação, resulta no ácido o-cumárico, cuja hidroxila fenólica condensa com uma unidade de glicose. Esse composto isomeriza no seu correspondente *cis*, o qual, por ciclização, forma a cumarina. A prenilação nas posições C-6 e C-8 do anel benzênico de uma 7-hidroxi-cumarina conduz à formação de pirano ou furanocumarinas (SIMÕES e colaboradores, 2000).

O teste para a avaliação da presença de cumarinas é baseado na conversão do ácido o-hidroxicinâmico em sal alcalino fluorescente, e deve-se à propriedade das cumarinas de se dissolverem em álcali cáustica, com clivagem do anel pirrólico e formação do ácido o-hidroxicinâmico ou sais de seus ânions. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida; no entanto, quando irradiamos com luz ultravioleta, a forma *cis* da molécula do sal migra para a forma *trans*, exibindo fluorescência com coloração azul ou verde amarelada dentro de poucos minutos, aumentando até o máximo. Comparações efetuadas entre a forma *cis* e *trans* do ânion cumarínico demonstraram que apenas na forma *trans* o hidrogênio do grupo fenólico está localizado para possibilitar sua quelação (anel de seis membros), visto que a insaturação não é bloqueada pelo grupo carboxila, havendo possibilidade da ligação quelato relacionar-se com a fluorescência. O foto-efeito também aparece em soluções alcalinas dos derivados cumarínicos que não possuem hidroxila livre ligada ao grupo benzênico, havendo relação entre os substituintes e o grau de fluorescência.

Derivados cumarínicos que tenham grupos OH livres ligados ao anel benzênico mostram fluorescência azul intensa no estado sólido e em soluções alcalinas, não ocorrendo foto-efeito em soluções alcalinas para esses compostos. Dessa forma, torna-se difícil estabelecer um teste específico para estas cumarinas, pois é difícil observar qualquer fluorescência produzida por irradiação, já que elas possuem fluorescência própria (NAKASHIMA, 1993).

Para essa pesquisa, adicionou-se, ao extrato hidroalcoólico, HCl 2N, até pH 1, e 5mL de HCl concentrado. A mistura foi resfriada e transferida para um

funil de separação para extração com éter etílico (2 X 10mL). As duas frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria até volume de 5mL. As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas ao banho-maria 50°C (30mL) até secar e recuperadas em 5mL de éter etílico.

Para tubos de ensaio, transferiu-se 3ml de cada extrato etéreo e adicionou-se 2ml de NaOH 2N. Os tubos de ensaio foram levados ao UV (365nm), por 15 minutos.

Para reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

Paralelamente, com o restante dos extratos etéreos, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, foi colocada ainda uma moeda e levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando em exposição por 15 minutos. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

#### 4.6.1.4 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

A observação da presença de antraquinonas é devida à ionização das hidroxilas fenólicas destes compostos, por meio da Reação de Borntraeger.

Foram transferidos, para cinco balões, 30ml de cada fração, e adicionados 5ml de solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, adicionando-se, em seguida, 30ml de H<sub>2</sub>O. Transferiu-se para um funil de separação, para extração com éter (2 X 10ml). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5ml, e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se 5ml de NH<sub>4</sub>OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva com observação de coloração vermelha.

#### 4.6.1.5 Pesquisa de Esteróides e Triterpenos

A reação de Liberman-Bouchard (anidrido acético – ácido sulfúrico concentrado) é empregada para a verificação de esteróides e triterpenos; os

primeiros desenvolvem coloração mutável com o tempo, enquanto que os últimos desenvolvem coloração estável (HASHIMOTO citado por SIMÕES *et al.*, 2000).

A reação de Keller-Kelliani é utilizada para a verificação da presença de glicosídeos cardiotônicos, que é determinada pela caracterização do núcleo esteroidal destes, além de outras formas, que detectam a presença de uma lactona insaturada em C-17, característica dos desoxi-açúcares (SIMÕES, 2000). A coloração azul ou verde na fase acética indica reação positiva para desoxi-açúcar (MATOS; MATOS, 1989).

Foram evaporados 30ml de cada fração, até a secura e, com o auxílio de um bastão, os resíduos foram redissolvidos em 5ml de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras assim preparadas pipetou-se 0,1; 0,5 e 1,0ml, que foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2ml com clorofórmio.

#### 4.6.1.5.1 Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1ml de anidrido acético e lentamente 2ml de  $H_2SO_4$  concentrado. A coloração indica:

- rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.
- Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.
- Amarela: grupamento metila no carbono 14.

#### 4.6.1.5.2 Reação de Keller Kelliani

Foram levados à secura 2ml dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2ml de ácido acético glacial e 0,2ml de solução aquosa de cloreto férrico 1%. As misturas foram então transferidas para tubos de ensaio contendo 2ml de  $H_2SO_4$ . O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

- azul: esteróides
- verde: triterpenos

#### 4.6.2 Extrato aquoso

Para o preparo do extrato aquoso foram pesados 40g do rizoma de *Dorstenia multiformis*, seco e moído, e adicionou-se 200ml de água (líquido extrator). Levou-se ao banho-maria por 1 hora a 70°C, sendo em seguida filtrado e o volume completado para 200ml com o líquido extrator.

Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

##### 4.6.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis encontrados principalmente nas flores e frutos, com colorações que vão do roxo ao violeta e azul. Encontram-se na forma de sais, e possuem caráter anfótero, ou seja, com ácidos formam sais de oxônio corados de vermelho; com bases reagem através das hidroxilas fenólicas livres e adquirem a coloração azul, devida à estrutura quinóide formada. Dessa forma, as colorações dos compostos antociânicos variam com o pH.

Para essa pesquisa foram realizados dois testes, descritos a seguir.

##### 4.6.2.1.1 Primeiro teste

Separou-se três porções de 5ml do extrato aquoso, em três tubos de ensaio previamente marcados. Procedeu-se da seguinte forma:

Tubo 1: acidificou-se com HCl 1% (até pH aproximadamente 4) – reação positiva observada para tons avermelhados.

Tubo 2: alcalinizou-se com NaOH (pH aproximadamente 10) - tons azulados.

Tubo 3: neutralizou-se a pH 7 - tons violáceos.

##### 4.6.2.1.2 Segundo teste



Transferiu-se, para um funil de separação, 10ml do extrato aquoso, e procedeu-se à extração com álcool butílico, obtendo-se duas frações de 10ml. As frações foram reunidas em uma cápsula de porcelana e concentradas até 5ml. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado, e levou-se para aquecimento até ebulição. A coloração vermelha indica formação de antocianidina, devido ao efeito batocrômico.

#### 4.6.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com conseqüente formação de espuma mediante agitação, caracterizando as propriedades emulsivas destes compostos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Utiliza-se os três tubos de ensaio preparados para o teste citado anteriormente (heterosídeos antociânicos), os quais são agitados energicamente, durante cinco minutos, e mede-se a altura da espuma formada. Em seguida, são deixados em repouso por 30 minutos e a presença de saponinas é determinada pela observação de espuma persistente, com altura superior a 1cm.

#### 4.6.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogênicos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas ( $\beta$ -glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A presença de heterosídeos cianogênicos na amostra é observada pela formação de isopurpurato de sódio, através da reação descrita abaixo.

A um tubo de ensaio, foram adicionados 5ml do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria ( $60^\circ\text{C}$ ) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

O papel picro-sódico é preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

#### 4.6.2.4 Pesquisa de Ácidos Voláteis

Procedeu-se da mesma forma que para o teste anterior (heterosídeos cianogênicos), utilizando-se uma fita de pH. A presença de ácidos voláteis é observada pela mudança de pH para valores abaixo de sete.

#### 4.6.2.5 Pesquisa de Taninos

Os taninos podem ser caracterizados por reações de coloração ou de precipitação. Como a presença de álcool pode interferir, este deve ser removido das amostras para a determinação. As reações tradicionais de precipitação com gelatina ou pó de pele, sais de alcalóides e metais pesados são ainda utilizadas para a detecção de compostos dessa classe. Taninos condensados e hidrolisáveis podem ser diferenciados através da reação de Stiasny (HCl concentrado e formol), ocorrendo precipitação destes últimos; no sobrenadante pode-se detectar a presença de taninos hidrolisáveis através, por exemplo, da reação com cloreto férrico, com desenvolvimento de coloração azul (SIMÕES *et al.*, 2000).

Foram transferidos 1ml de extrato aquoso para cinco tubos de ensaio e adicionou-se os seguintes reagentes:

Tubo 1: 3 gotas de cloreto férrico. Coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado – resultado positivo para taninos.

Tubo 2: 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. Coloração azul ou verde – resultado positivo.

Tubo 3: 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina. Formação de precipitado – resultado positivo.

Tubo 4: 5ml de ácido acético (gota a gota) e 5ml de acetato de chumbo. Presença de precipitado – resultado positivo.

Tubo 5: 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Desenvolvimento de precipitado – resultado positivo.

#### 4.6.2.5.1 Diferenciação entre taninos hidrolisáveis e condensáveis

Uma alíquota de 20ml do extrato aquoso foi transferida para um balão, e adicionados 6ml de formaldeído e 4ml de HCl 37% fumegante. Permaneceu em refluxo por uma hora, acoplado a um condensador. Filtrou-se e lavou o resíduo com etanol 50%, para retirar o excesso de formaldeído e HCl, e sobre o resíduo adicionou-se KOH 5%, com desenvolvimento de coloração. Dividiu-se, então, o material em duas porções.

1º porção: adição de gotas de solução aquosa de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  5%. O desenvolvimento de coloração indica presença de taninos condensados.

2º porção: adição de excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  a 1%. Desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

#### 4.6.2.6 Pesquisa de Ácidos Fixos

A reação de caracterização de ácidos fixos se dá através do reativo de Nessler, que identifica a amônia associada em forma de sal amoniacal. Este reativo contém amônia, e a visualização é indicada pela formação de um sal amoniacal na presença de ácidos fixos. Os ácidos fixos são identificados separadamente dos ácidos voláteis porque durante o processo é realizado tratamento com ácido sulfúrico, e posterior evaporação em banho-maria, fazendo com que estes volatilizem.

Em um balão, foram adicionados 20ml do extrato aquoso e 2ml de NaOH 1N, que permaneceram em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, acidificou-se com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N e procedeu-se à extração com éter etílico (3 porções de 10ml). Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50° C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa por 10 minutos, resfriado e adicionou-se 5ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1N. Em uma tira de papel de filtro concentrou-se duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na

estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos. Os ácidos fórmico, propiônico e aminoacético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

#### 4.6.2.7 Pesquisa de Aminogrupos

Os aminogrupos são detectados por nebulização com o reativo de Ninhidrina e aquecimento. O reativo de Ninhidrina detecta os compostos em cuja estrutura haja presença de nitrogênio, principalmente aminoácidos.

Foram concentrados 5ml do extrato aquoso até aproximadamente 1ml (a 50° C). Em dois pontos previamente determinados, em uma cromatoplaça de CCD, depositou-se 3 gotas do extrato concentrado e, após seco, colocou-se uma gota do reativo Ninhidrina sobre uma das manchas, aquecendo em estufa durante 15 minutos (90-100° C). O desenvolvimento de coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupos. Exceção: prolina e hidroxiprolina – cor amarela.

### 4.7 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

#### 4.7.1 Isolamento de compostos da porção solúvel em acetona

A porção solúvel em acetona (I) foi analisada por CCD analítica (placas de sílica gel Merck), utilizando a fase móvel tolueno/acetato de etila, nas proporções 93:7 e 80:20, a qual demonstrou ser a mais adequada para a separação dos compostos presentes nessa amostra. A placa cromatográfica foi observada na luz ultravioleta, em ondas curtas e longas, e a revelação se deu utilizando-se como reveladores solução alcoólica de hidróxido de potássio a 5% e solução de vanilina sulfúrica.

A porção I foi eluída em coluna cromatográfica (50 x 7,5 cm) de silicagel 60 (0,063 a 0,200mm) Merck.

A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica-gel 60 na proporção de 5 partes em relação à quantidade de amostra, e evaporada à

secura em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização. Utilizando-se coluna de vidro, preparou-se a sílica-gel a ser depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha. A quantidade de amostra utilizada para a coluna cromatográfica em questão foi de 38,9g, correspondente à porção solúvel em acetona do resíduo do extrato bruto.

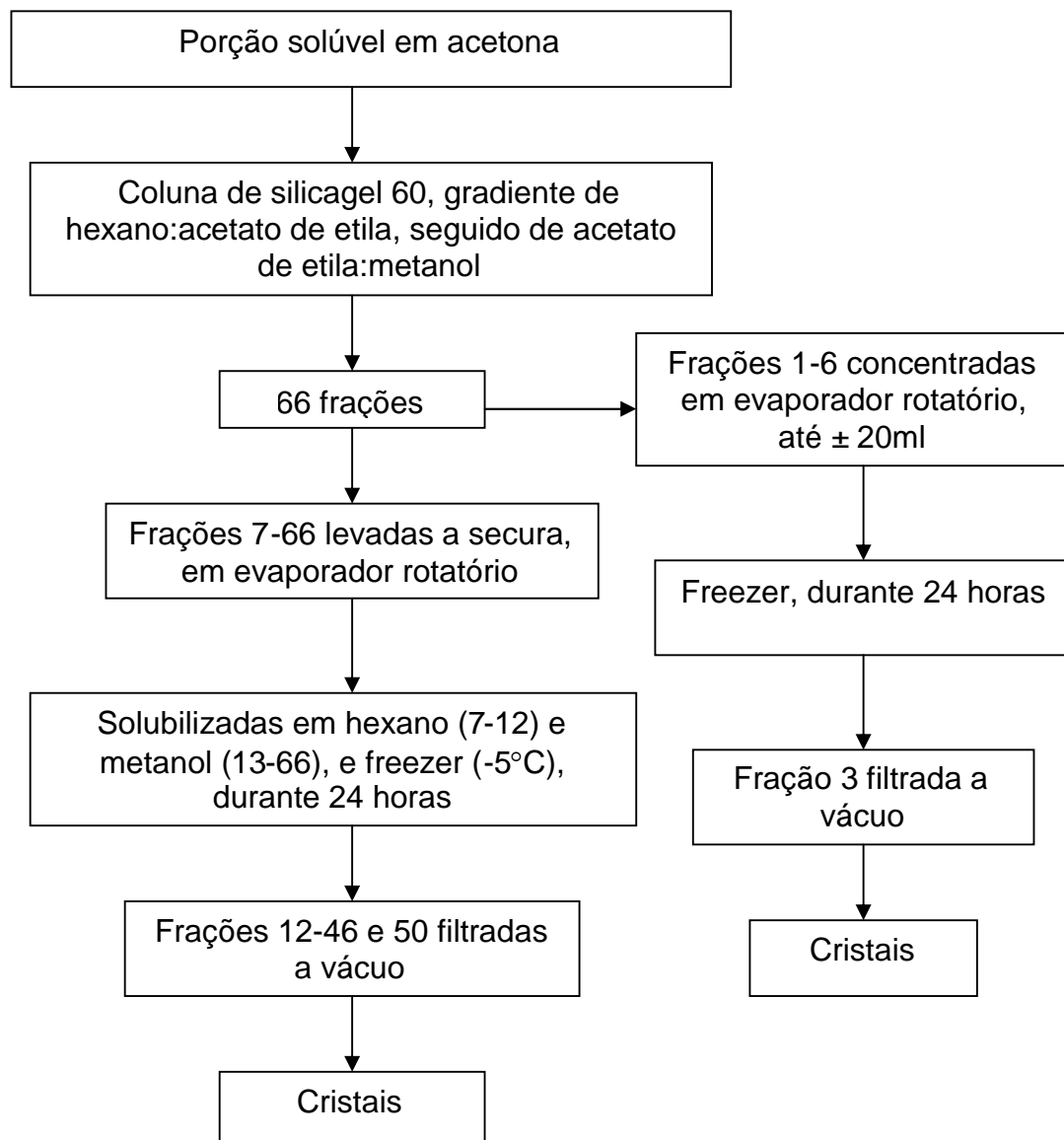
O sistema eluente utilizado iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 100% de acetato de etila (utilizou-se 200ml para cada gradiente de fase móvel). Foram coletadas 46 frações, com aproximadamente 100ml cada. A eluição continuou com acetato de etila, utilizando metanol como gradiente, com variação de 10%; foram coletadas 20 frações, com aproximadamente 100ml cada, totalizando 66 frações.

As frações 1-6 foram concentradas em evaporador rotatório, a pressão reduzida e temperatura de, aproximadamente 40°C (aquecimento em banho-maria), até um volume aproximado de 20ml de hexano. Em seguida, foram levadas ao freezer (-5°C). As frações 7-66 foram levadas à secura, em evaporador rotatório, sendo solubilizadas em 20ml de hexano (frações 7-12) e metanol (frações 13-66), e levadas ao freezer (-5°C). Esses procedimentos foram realizados com o objetivo de se obter uma pré-purificação das substâncias presentes nas frações coletadas.

Após 24 horas, as frações que apresentaram precipitado foram filtradas a vácuo e o material resultante das filtrações foi pesado e acondicionado em frascos, separadamente.

O material correspondente a cada fração foi analisado por CCD, nos mesmos sistemas utilizados anteriormente. As frações semelhantes foram reunidas e obtido o peso total.

FIGURA 13 – FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO FRACIONAMENTO DA PORÇÃO SOLÚVEL EM ACETONA



De acordo com a figura 13, os cristais obtidos a partir das frações 12-46 e 50 serão denominados CRS1, e os cristais obtidos da fração 3 serão denominados CRS2.

#### 4.7.2 Identificação dos compostos isolados da porção solúvel em acetona

Para identificação, os compostos isolados da porção solúvel em acetona foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa e  $^{13}\text{C}$  RNM.

Para  $^{13}\text{C}$  RNM, utilizou-se espectrofotômetro de Brucker® modelo AC 200, operando-se a 50 MHz. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidades (ppm). O solvente utilizado na espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  RNM foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e como padrão de referência interna utilizou-se TMSO.

#### 4.7.3 Análise via CLAE de CRS1

O material denominado CRS1 foi submetido a análise via CLAE a fim de verificar a relação quantitativa entre os compostos identificados pelas técnicas de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e CG/EM para a respectiva amostra.

Para essa análise, utilizou-se cromatógrafo de alta eficiência da marca Merck. O método utilizado foi o método para pesquisa de fenólicos, utilizando uma coluna  $\text{C}_{18}$  com bomba A tipo L7100. Como fase móvel utilizou-se:

Solvente A ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,2% +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N)

Solvente B (MEOH)

Solvente C (ACN 90 +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,002N +  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,2%)

Solvente D (ACN)

Os padrões psoraleno e bergapteno foram utilizados na concentração 0,1mg/ml. O volume de injeção, para amostra e padrões, foi de 20 $\mu\text{l}$ .

#### 4.7.4 Isolamento de compostos da porção não solúvel em acetona

A porção não solúvel em acetona (II) foi analisada por CCD, nos mesmos sistemas utilizados para a porção I.

A porção II foi eluída em coluna contendo as mesmas proporções de sílica-gel 60 citadas para a coluna anterior, em relação à quantidade de amostra. Para essa coluna foram utilizados 22,7g de amostra correspondente à porção não solúvel em acetona do resíduo do extrato bruto, em coluna de vidro de dimensões 20X4,5cm.

O sistema eluente utilizado foi o mesmo citado para a coluna com a porção I (utilizando-se 100ml para cada gradiente de fase móvel), tendo sido coletadas 105 frações, para a eluição com hexano/acetato de etila, e 50 frações, para a eluição com acetato de etila/metanol, totalizando 155 frações, com aproximadamente 20ml cada.

Após processo de pré-purificação, as frações que apresentaram precipitado foram analisadas por CCD analítica, utilizando a mesma fase móvel e reveladores já citados. As frações semelhantes foram reunidas e obtido o peso total.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizados o extrato etanólico bruto e as frações obtidas do extrato.

A metodologia empregada foi difusão em gel, adaptada de KONEMAN, 1993, utilizando ágar Müller-Hinton, e verificando zonas de inibição de crescimento para as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*, em presença de amostras do extrato, das frações e das substâncias isoladas em diferentes concentrações, impregnadas em discos de papel. Este estudo baseia-se na difusão das substâncias impregnadas nos discos no meio de cultura e incubação em temperatura favorável ao desenvolvimento dos microrganismos em teste.

A comprovação da atividade antibacteriana ocorre pela formação de halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a amostra em estudo.

Para a escolha dos microrganismos a serem testados levou-se em consideração a facilidade e rapidez de crescimento destes, uma vez que crescem rapidamente em meios de cultura utilizados na rotina, não necessitando de um meio específico para o seu crescimento. Além disso, avaliou-se a disponibilidade e significância clínica, procurando-se testar a atividade antibacteriana em maior quantidade possível de microrganismos.



Os ensaios foram processados em câmara de fluxo laminar, em condições totalmente assépticas.

#### 4.8.1 Preparo do material

Antes da realização dos ensaios, o material utilizado (vidrarias, pinças e os discos) foi esterilizado em autoclave a 120°C, por 15 minutos.

#### 4.8.2 Preparo das amostras

O extrato etanólico bruto e as frações foram conduzidos à secura, em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e diluídos com metanol, a fim de obter as concentrações desejadas de 100%, 50%, 25% e 12,5%, de acordo com os valores de teor de sólidos obtidos no item 4.5.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS IMPREGNADAS NOS DISCOS DE PAPEL

| DILUIÇÃO DA AMOSTRA | EXTRATO BRUTO ETANÓLICO | FRAÇÃO HEXANO | FRAÇÃO CLOROFÓRMIO | FRAÇÃO ACETATO DE ETILA |
|---------------------|-------------------------|---------------|--------------------|-------------------------|
| 100,0%              | 785,0µg                 | 380,0µg       | 467,0µg            | 145,0µg                 |
| 50,0%               | 392,5µg                 | 190,0µg       | 233,5µg            | 72,5µg                  |
| 25,0%               | 196,2µg                 | 95,0µg        | 116,8µg            | 36,3µg                  |
| 12,5%               | 98,1µg                  | 47,5µg        | 58,4µg             | 18,1µg                  |

#### 4.8.3 Preparo dos discos de papel

Os discos de papel filtro esterilizado (6mm), foram espalhados em placas de Petri esterilizadas e devidamente identificadas, e impregnados com 10µl das amostras previamente preparadas.

Preparou-se também discos controle, impregnados com metanol, utilizado no preparo das amostras.

Esses procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, a fim de evitar o contato com os microrganismos presentes no ambiente.

Os discos foram levados à secura, a 40°C por 24 horas, com as placas de Petri devidamente fechadas.

#### 4.8.4 Meio de cultura

O meio de cultura ágar Müller-Hinton foi escolhido por ser um meio, embora não enriquecido, suficientemente nutritivo para permitir o desenvolvimento de colônias das bactérias acima citadas (KONEMAN *et al.*, 1993).

O meio foi preparado 24 horas antes do teste, sendo autoclavado a 120°C por 15 minutos e, em seguida, acondicionado em placas de Petri esterilizadas, com o auxílio de uma lamparina, para evitar contaminação com os microrganismos do ambiente.

#### 4.8.5 Preparo do inóculo

Os microrganismos foram adquiridos comercialmente (marca Newprov®). Foram utilizadas culturas puras (ATCC – American Type Culture Collection), cepas *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27283), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), as quais foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 35°C, 24 horas antes do teste.

As culturas assim obtidas, para cada bactéria, foram diluídas em 5ml de salina estéril, padronizando-se a solução de acordo com a turbidez do tubo número 5 da escala de Mac Farland (0,5ml de BaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,048M – 1,75% p/v em 99,5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36N – 1% v/v), a fim de se obter a concentração aproximada de um milhão e quinhentos mil bactérias por ml.

A inoculação foi realizada com auxílio de swab estéril, dentro de câmara de fluxo laminar.

#### 4.8.6 Teste de atividade antibacteriana

Para cada uma das amostras testadas procedeu-se da seguinte maneira: em cada placa inoculada, foram distribuídos seis discos de papel, impregnados com a amostra pura, diluída a 50%, 25% e 12,5%, além de um disco impregnado apenas com metanol e um disco controle positivo, com cloranfenicol.

As placas foram incubadas em estufa, a 35°C, durante 24 horas. Após esse período, foram retiradas da estufa e medidos os halos de inibição, quando presentes, com auxílio de régua.

Paralelamente, foram utilizadas placas com os mesmos microrganismos citados e discos apenas com controles positivos: cefalotina e cloranfenicol, e controle negativo: metanol.

A escolha dos antimicrobianos utilizados para controle positivo de inibição seguiu critérios de disponibilidade (para o antimicrobiano cloranfenicol) e emprego na terapêutica, para o antimicrobiano cefalotina (CASTRO *et al.*, 2002).

O metanol foi utilizado para controle pelo fato de ter sido empregado na diluição das amostras em estudo.

Os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

O teste da concentração mínima inibitória seguiu metodologia adaptada de KONEMAN, 1993. O teste foi realizado com o extrato etanólico bruto e as frações obtidas do extrato.

Segundo este método os microrganismos são adicionados a meio de cultura líquido, contendo as amostras em várias concentrações, permanecendo, as amostras e os microrganismos, difundidos no meio.

##### 4.9.1 Preparo do inóculo

As cepas das bactérias em teste foram repicadas em 10ml de caldo triptico de soja e incubadas a 35°C, 24 horas antes do teste.

Após as 24 horas de incubação, os tubos contendo o caldo e os microrganismos foram comparados com a turbidez do tubo 0,5 da escala de MacFarland. Do caldo tríptico de soja contendo os microrganismos, foram retirados 2ml e colocados em 100ml (2%) de solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada. Este procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar.

#### 4.9.2 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas conforme descrito para o teste de difusão em gel no item 4.8.2, ou seja, foram levadas à secura e ressolubilizadas em metanol, de acordo com o valor de teor de sólidos obtido para cada amostra. Essas amostras foram adicionadas a tubos de ensaio contendo caldo tríptico de soja, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64.

#### 4.9.3 Teste da concentração inibitória mínima

Ao meio de cultura contendo as amostras, foi adicionado 1,0ml da suspensão de microrganismos obtida conforme descrito anteriormente. Como controle positivo foi preparado tubo com 1,0ml da suspensão de bactérias e 1,0ml de caldo nutritivo; e como controle negativo tubo com o extrato diluído em caldo nutritivo, na concentração 1:2, sem o inóculo de microrganismos. Dessa forma, para cada amostra foram preparados nove tubos, e em duplicata, sendo esses procedimentos realizados em câmara de fluxo laminar. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas e decorrido o tempo procedeu-se às leituras.

A leitura do resultado é feita por comparação de cada tubo com o controle negativo, sendo considerado como MIC a menor concentração da amostra em que não houve crescimento bacteriano.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Em estudos de atividade alelopática procura-se determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma planta receptora (MALHEIROS; PERES, 2001).

O bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição, ou, algumas vezes, a estimulação da germinação e do crescimento de sementes de espécies silvestres ou de culturas, visto que são ensaios simples, rápidos e requerem pequenos volumes de solução (YUNES & CALIXTO, 2001).

Para avaliação da atividade alelopática foram utilizados o extrato etanólico bruto e as frações obtidas do extrato, de acordo com o método descrito em PEITZ, 2003.

A metodologia utilizada foi a de verificação da ocorrência de efeitos inibitórios ou estimulatórios na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* (alface), frente às amostras testadas, em diferentes concentrações.

#### 4.10.1 Preparo das amostras

As sementes utilizadas na avaliação da germinação e do crescimento foram de *Lactuca sativa*, classe fiscalizada, cultivar Babá. Esta espécie foi escolhida por ser amplamente citada na literatura e apresentar características apropriadas para os testes: maior sensibilidade aos efeitos alelopáticos das plantas, ser facilmente encontrada, requerer pequeno período para a germinação e para o crescimento, não precisar de foto-período, possuir umidade e temperatura de germinação e crescimento bem definidas, a radícula da plântula apresentar um eixo único, o que facilita a leitura do crescimento, além do tamanho da semente ser considerado mais uniforme (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; ANDRADE, 2003).

Além disso, a semente de *Lactuca sativa* é empregada em ensaios por apresentar germinação uniforme (DIETZ; WINTERHALTER, 1996), ser pequena, porém com grande superfície de contato, tornando-a bastante sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato do meio (MALHEIROS; PERES, 2001).

O extrato bruto e as frações foram diluídos em metanol, de forma a se obter 0,6; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg em 2ml de metanol. Todas as diluições foram preparadas em duplicata, para os testes de germinação e de crescimento. Para o preparo destas soluções utilizou-se uma solução-mãe

preparada com extrato e frações secas a 50°C em banho-maria, e substâncias isoladas, diluídas em metanol na proporção de 1mg/ml. O metanol foi escolhido como solvente com o intuito de obter dissolução completa da amostra a ser analisada.

#### 4.10.2 Preparo do material

As caixas Gerbox utilizadas nos testes foram previamente lavadas, passadas em solução de hipoclorito diluída e enxaguadas com água.

As amostras foram embebidas em pedaços de papel de filtro número 6, os quais foram levados à estufa e mantidos a 40°C, durante 24 horas, para evaporação total do solvente. Paralelamente, em cada caixa Gerbox utilizada, foi acondicionado um pedaço de papel de filtro isento de amostra, com a finalidade de manter as condições de umidade do ambiente (esse procedimento foi realizado com o auxílio de luvas e máscara, para evitar a contaminação do papel de filtro pela manipulação do operador).

Após 24 horas, cada papel de filtro embebido com a amostra na sua respectiva concentração, foi posicionado nas caixas Gerbox, às quais foi adicionado 3ml de água destilada e distribuídas 40 sementes de *Lactuca sativa*, em 4 repetições consecutivas de 10 sementes para cada caixa. A água destilada foi utilizada em quantidade segundo KRZYZANOWSKI, VIEIRA, FRANÇA NETO (1999), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel.

O controle foram caixa apenas com água destilada e sementes, e caixa com metanol, água destilada e sementes, nas mesmas condições do experimento.

Os procedimentos acima descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar, a fim de evitar contaminação pelos microrganismos presentes no ar.

O material preparado e os controles foram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador Mangelsdorf (Biomatic), com limites de temperatura entre 17 e 20°C. Este material foi utilizado nos testes de germinação e de crescimento.

Para análise estatística empregou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A verificação das diferenças das médias estatisticamente significantes foi realizada por meio do teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. O teste de Scott-Knott foi escolhido por ser claro, objetivo e isento de

ambigüidades (presentes na maioria dos testes de comparações múltiplas). O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias.

#### 4.10.3 Teste de germinação

Para o estudo da germinação, fez-se leitura diária, sempre no mesmo horário, contando o número de sementes que germinaram em cada caixa e retirando-as das caixas. Este procedimento foi realizado durante 7 dias, dentro de câmara de fluxo laminar. As sementes foram consideradas germinadas conforme descrito por DE FEO, DE SIMONE e SENATORE (2002) e ADEGAS, VOLL e PRETE (2003), ou seja, quando se tornou visível a protusão da radícula através do tegumento.

Calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo MAGUIRE (1962) para cada repetição de cada tratamento. O referido índice é calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidos ao Teste de Scott-Knott.

#### 4.10.4 Teste de crescimento

O material utilizado para a leitura do crescimento foi mantido no germinador durante 7 dias. Após esse período, as sementes de cada caixa foram retiradas e medidos o comprimento da radícula (que origina a raiz) e do hipocótilo (que origina o caule), com auxílio de papel milimetrado.

Submeteram-se os resultados das leituras de crescimento ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias, as quais também foram comparadas em porcentagem, considerando-se o tratamento controle com água destilada como 100%.

Após medir os comprimentos da radícula e do hipocótilo, as quarenta plântulas de cada tratamento foram reunidas para verificação da massa e posterior comparação com a massa do tratamento controle.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente (em conjunto com outros) para caracterizar diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de (nitrogênio) oxigênio (ARNAO, 2000).

Um antioxidante biológico é definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (BENZIE, 1996).

##### 4.11.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas, bem como suas frações. Possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

Este método, descrito por PRIETO (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695nm.

O complexo fosfomolibdênico, formado pela reação da solução de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (28ml, 0,1mol/l) com solução de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (12ml, 0,03mol/l) e solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20ml, 3mol/l), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para 100ml, possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz.

Para o preparo do complexo fosfomolibdênico, todos os reativos foram transferidos para um balão volumétrico e o volume foi completado para 100ml com água destilada.



O extrato e frações foram levados à secar em banho-maria (40°C), e a partir do material seco, bem como das substâncias isoladas, preparou-se soluções aquosas com concentração final de 200µg/ml, utilizando-se uma quantidade mínima de metanol para dissolver as amostras, quando necessário. Destas, foram tomados 0,3ml e adicionado 1ml de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 min. Após resfriamento, procedeu-se a leitura a 695 nm, em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu®, para obtenção das absorvâncias, usando-se água destilada como branco. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à vitamina C (200µg/ml) usada como padrão, e rutina (200µg/ml) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00. A vitamina C é um dos antioxidantes biológicos mais eficazes e mais conhecidos (YOUNGSON, 1996).

#### 4.11.2 Abordagem do potencial antioxidante por cromatografia de camada delgada

De acordo com o método descrito por CONFORTI *et al* (2002) e WAGNER e BLADT (1996), as amostras e padrões (10mg/ml) foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), usando-se como fase móvel a mistura hexano:20, acetato de etila:30, ácido fórmico:2. Em seguida, as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH em etanol e fotografadas com auxílio de câmera digital.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TEOR DE SÓLIDOS NO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E NAS FRAÇÕES

A tabela 2 relaciona o teor de sólidos do extrato etanólico bruto e das frações obtidas de *Dorstenia multiformis* Miquel, em relação à quantidade de amostra e à quantidade de material vegetal.

TABELA 2 – TEOR DE SÓLIDOS NA PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Dorstenia multiformis* MIQUEL

| Extrato/fração          | Resíduo seco (mg/ml) | Rendimento (g%) em relação à massa do vegetal seco (5kg) |
|-------------------------|----------------------|--|
| Extrato etanólico bruto | 78,5                 | 7,22   |
| Fração hexano           | 38,0                 | 3,50   |
| Fração clorofórmio      | 46,7                 | 4,30   |
| Fração acetato de etila | 14,5                 | 1,33   |

### 5.2 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE *Dorstenia Multiformis*

| Parâmetro | Extrato etanólico |
|-----------|-------------------|
| Odor      | Adocicado         |
| Sabor     | Adocicado         |
| Coloração | Marrom            |
| pH        | 6,0               |

### 5.3 PESQUISA DE GRUPOS FITOQUÍMICOS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES

As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da análise sistemática qualitativa preliminar para a identificação de grupos de metabólitos secundários presentes em cada fração obtida de *Dorstenia multiformis*, Miquel.

#### 5.3.1 Análise Sistemática com Extrato alcoólico 20%

Conforme pode ser observado nos resultados da análise preliminar, tabela 4, as cumarinas estão presentes em todas as frações analisadas, indicando que a espécie *Dorstenia multiformis* é rica em cumarinas, o que confirmou o descrito na literatura para o gênero *Dorstenia*.

Na pesquisa de flavonóides, a cor visualizada foi a cor vermelha a vermelho sangue, nas frações clorofórmio e acetato de etila. O aparecimento da cor vermelha a vermelho sangue é indicativo da presença de flavonóides da classe dos flavonóis, confirmada pela presença de fluorescência amarela esverdeada na Reação de Taubock, tornando nítida a presença desses compostos nas referidas frações. A presença de flavonóides é amplamente descrita na literatura para o gênero *Dorstenia*.

Na pesquisa de esteróides e/ou triterpenos, as características apresentadas pela reação de Liberman – Bouchard indicou a presença de triterpenos, o que foi observado nitidamente em todas as frações analisadas, confirmando o indicado na literatura para o gênero. A coloração amarela, observada para a fração hexano, foi indicativa de grupamento metila no carbono 14, enquanto que a coloração rósea, observada nas frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica indicou presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8, sendo ambas características de estruturas terpenóides.

A única amostra que apresentou reação positiva para a reação de Keller-Kelliani foi a fração hexano, com desenvolvimento de coloração azul, indicativa da presença de esteróides. O hexano é um líquido extrator com baixa hidrofília,

o que arrasta mais facilmente o grupo esteroidal, uma vez que se trata de uma molécula orgânica grande.

TABELA 4 - ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Dorstenia multiformis*

| Análise                    |                          | Extrato Hidroalcoólico | Fração Hexano | Fração Clorofórmio | Fração Acetato de etila |
|----------------------------|--------------------------|------------------------|---------------|--------------------|-------------------------|
| Alcalóides                 | Reativo Mayer            | -                      | -             | -                  | -                       |
|                            | Reativo Dragendorff      | -                      | -             | -                  | -                       |
|                            | Reativo Bouchardat       | -                      | -             | -                  | -                       |
|                            | Reativo Bertrand         | -                      | -             | -                  | -                       |
| Flavonóides                | Leucoantocianidinas      | -                      | -             | -                  | -                       |
|                            | Heterosídeos flavônicos  | -                      | -             | vermelho           | Vermelho                |
|                            | Oxálico bórico           | -                      | -             | flsc               | Flsc                    |
|                            | Pacheco                  | -                      | -             | -                  | -                       |
|                            | Zinco em HCl             | -                      | -             | vermelho           | Vermelho                |
| Cumarinas                  | Tubo                     | flsc                   | -             | flsc               | Flsc                    |
|                            | Papel                    | flsc                   | flsc          | flsc               | Flsc                    |
| Antraquinonas              |                          | -                      | -             | -                  | -                       |
| Esteróides/<br>triterpenos | Reação Liberman-Bouchard | Rosa                   | Amarelo       | Rosa               | Rosa                    |
|                            | Reação Keller-Kelliani   | -                      | Azul          | -                  | -                       |

\* flsc: fluorescência

No extrato aquoso foram encontrados os seguintes grupos químicos; taninos condensados, aminogrupos e ácidos fixos, de acordo com a coloração característica para cada reação (tabela 5).

Na pesquisa de taninos, houve desenvolvimento de coloração verde com o cloreto férrico 1%, indicando a presença de taninos condensados.

A presença de amino grupos foi confirmada com o aparecimento de coloração azul violácea.

No ensaio para verificação de ácidos fixos, houve aparecimento de coloração marrom, indicando resultado positivo.

TABELA 5 - ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO

| Análise                   |               | Extrato aquoso |
|---------------------------|---------------|----------------|
| Heterosídeos antociânicos |               | -              |
| Heterosídeos saponínicos  |               | -              |
| Heterosídeos cianogênicos |               | -              |
| Ácidos voláteis           |               | -              |
| Taninos                   | Hidrolisáveis | -              |
|                           | Condensados   | Verde          |
| Ácidos fixos              |               | Marrom         |
| Aminogrupos               |               | Violeta        |

## 5.4 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

### 5.4.1 Análises realizadas em cromatografia em camada delgada

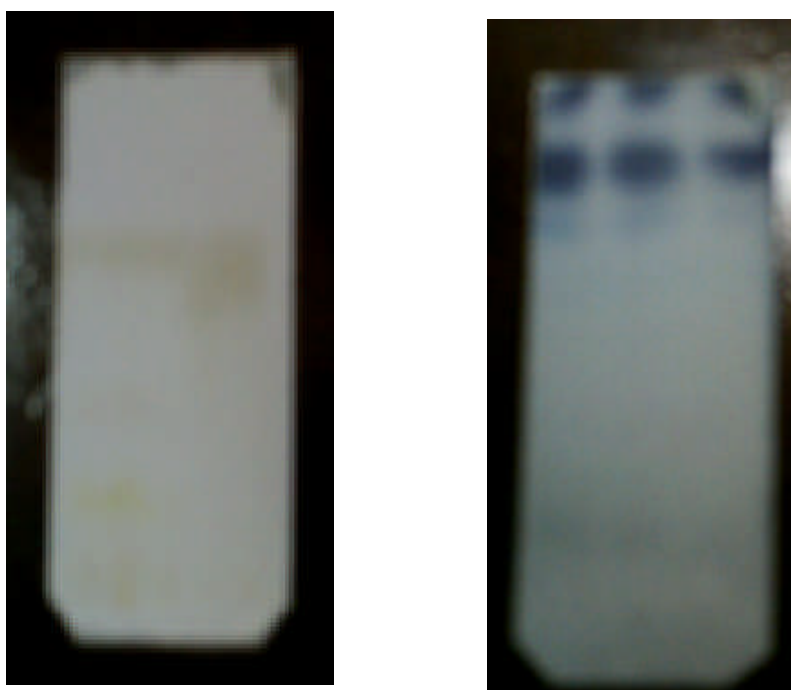
A análise por CCD, do material correspondente às porções solúvel (I) e não solúvel (II) em acetona revelou a presença de um composto principal, em quantidade muito maior que os demais compostos presentes, sendo esse composto o mesmo para as duas porções. A revelação com solução de KOH produziu coloração amarelo intenso, evidenciando a presença de cumarinas, inclusive para o composto principal. A revelação com vanilina sulfúrica evidenciou algumas manchas pequenas, coradas sutilmente de violeta, indicando a presença de esteróides e/ou triterpenos nas amostras, porém em quantidade muito menor que os demais compostos presentes.

A análise por CCD, do material resultante das frações da coluna cromatográfica, da porção solúvel em acetona, indicou a presença de um

composto presente em grande quantidade, nas frações 13 - 46 e 50, e outro composto presente em menor quantidade. A revelação com solução alcoólica de KOH produziu a coloração amarelo intenso na mancha característica do composto principal, e amarelo menos intenso para a outra mancha, caracterizando os compostos como sendo cumarínicos.

As frações 3 e 12, analisadas por CCD, apresentaram três compostos que não deram reação por revelação com solução de KOH, indicando a ausência de compostos cumarínicos para essas amostras. A revelação com solução de vanilina sulfúrica produziu coloração violeta intenso, indicando a presença de esteróides e/ou triterpenos nessas frações.

FIGURA 14 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA COM A PORÇÃO SOLÚVEL EM ACETONA



## 5.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NAS AMOSTRAS CRS1 e CRS2

### 5.5.1 Identificação dos Compostos presentes na amostra CRS1 por Cromatografia Gasosa acoplada a massa

A partir da análise cromatográfica em cromatografia gasosa acoplada a massa da amostra CRS1 pode-se observar na figura 15 e figura 16 a ocorrência de absorção em 11,19 min indicativo de tratar-se da possível estrutura química do psoraleno e outro pico em 13,49 min, correspondendo a possível estrutura do bergapteno, estes foram confirmados pelo espectro de RMN-13C e 1H conforme demonstrado nas figuras 21 e 22. Ainda no espectro de CG-EM, figura 16, uma outra intensidade de pico em 13,39min refere a possibilidade de uma ocorrência do isopsoraleno apresentado na figura 18 não sendo possível confirmá-la por meio do espectro de RMN-13C e 1H. Na figura 17 tem-se o cromatograma do banco de dados do equipamento que apresenta a fragmentação compatível com o isopsoraleno. Na figura 16 tem-se o espectro do segundo composto isolado da fração CRS1 indicando uma intensidade de pico em menor concentração em 13,49min, compatível com a estrutura do bergapteno. Na figura 19 pode-se observar o cromatograma de fragmentação do banco de dados do equipamento indicando a estrutura do psoraleno ( DATA BASE / NIST, 1998).

FIGURA 15 – CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A MASSA DA AMOSTRA CRS1

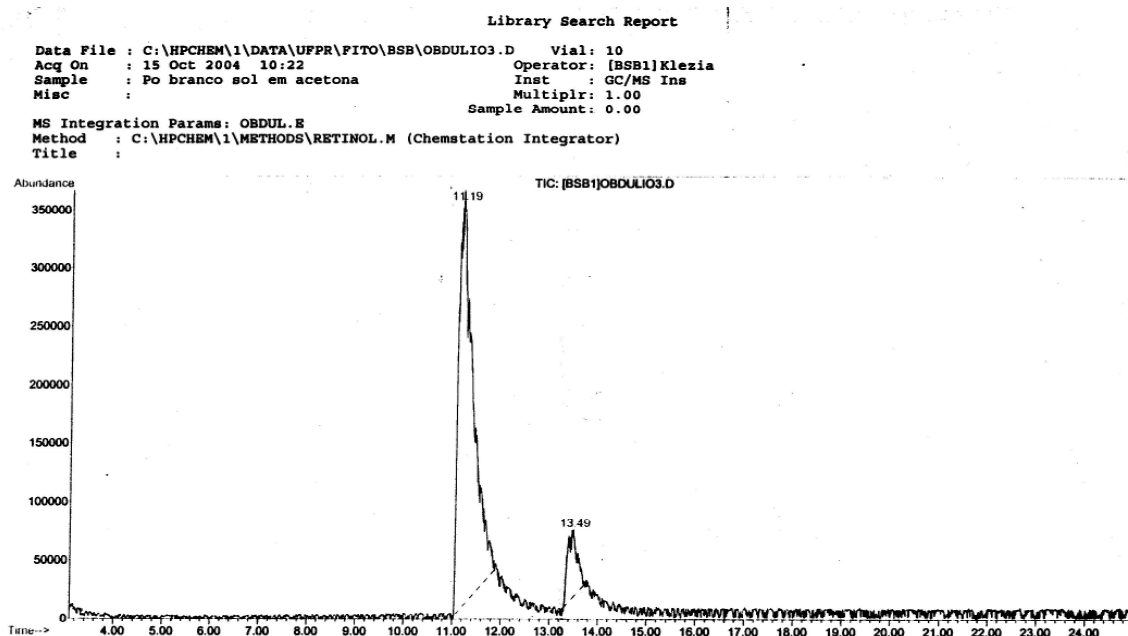


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DE CG/MS, RELATIVO À ANÁLISE DA AMOSTRA CRS1

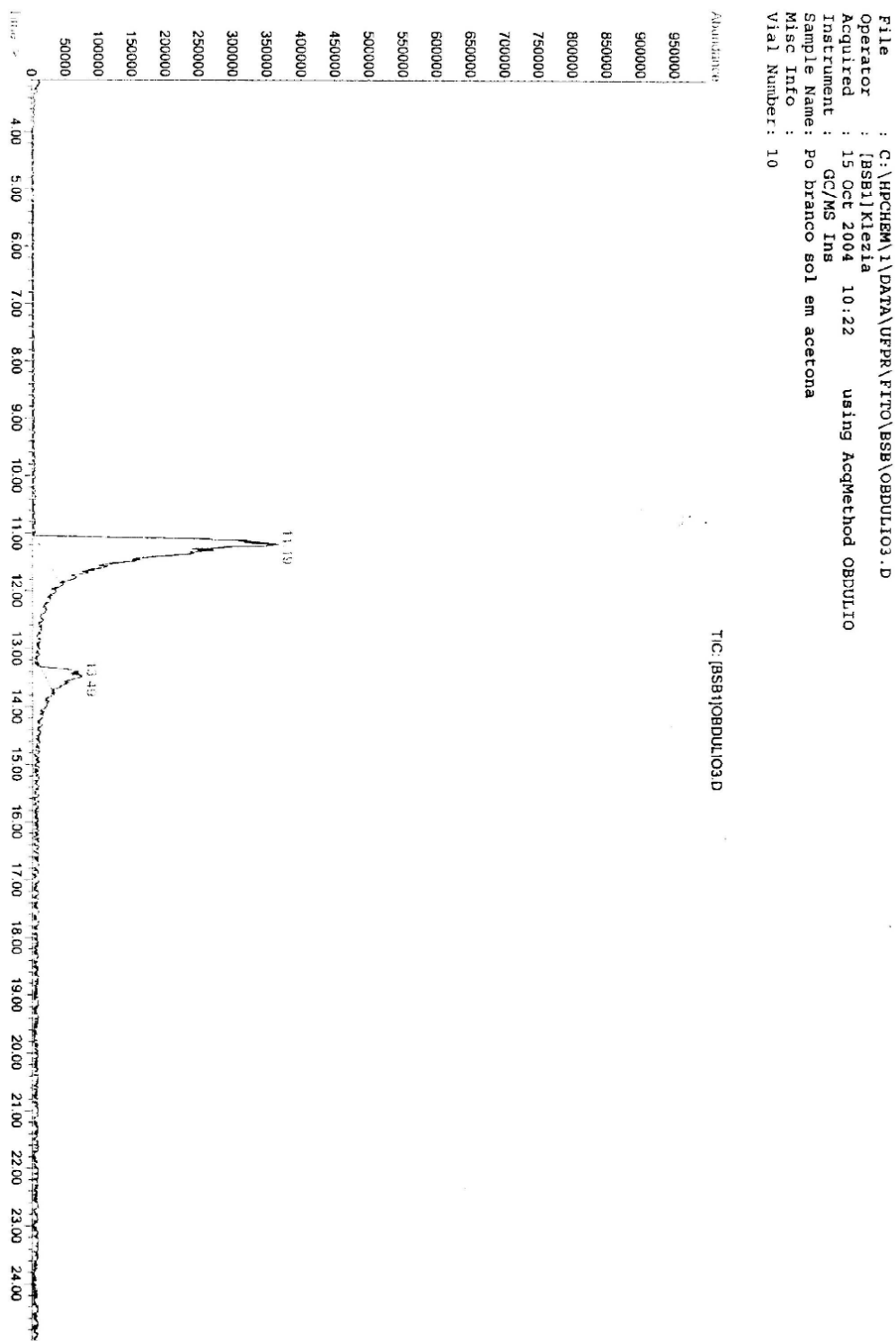




FIGURA 17 - CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A MASSA DA AMOSTRA CRS1  
PARA O ISOPSORALENO DO DATABASE/NIST98

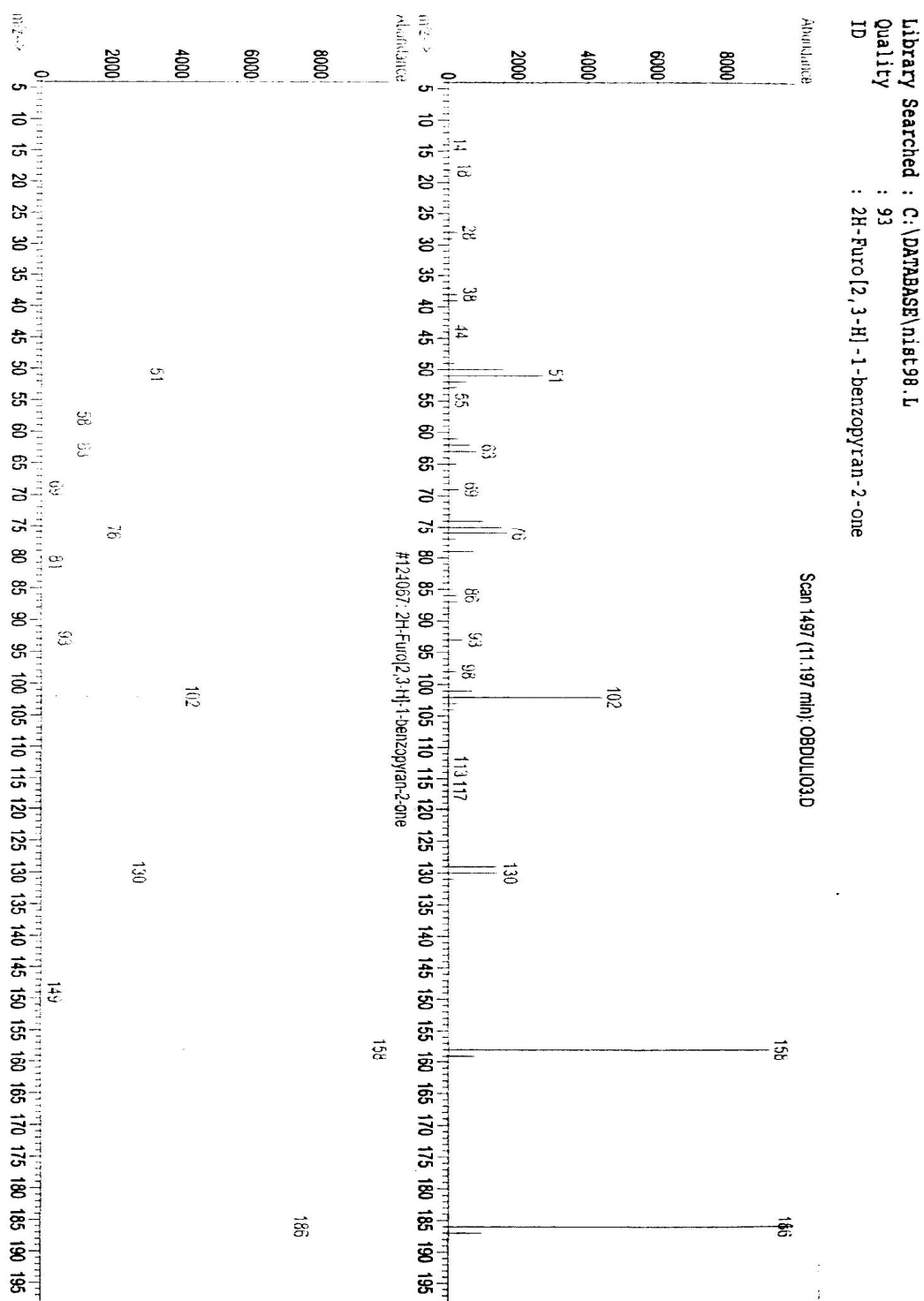


FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DO ISOPSORALENO DATABASE/NIST 1998

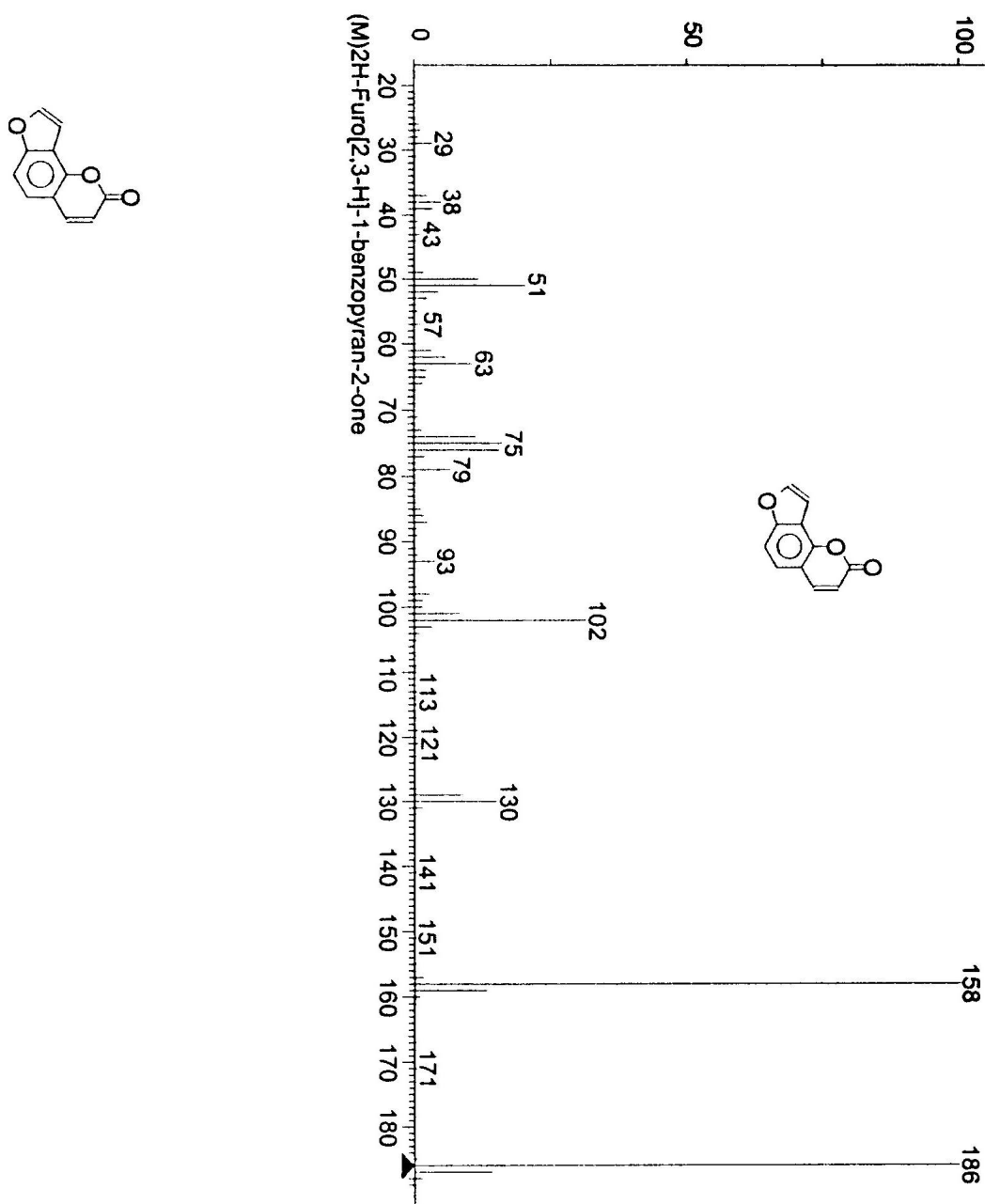


FIGURA 19- CROMATOGRAMA DO PSORALENO DATABASE/NIST 1998

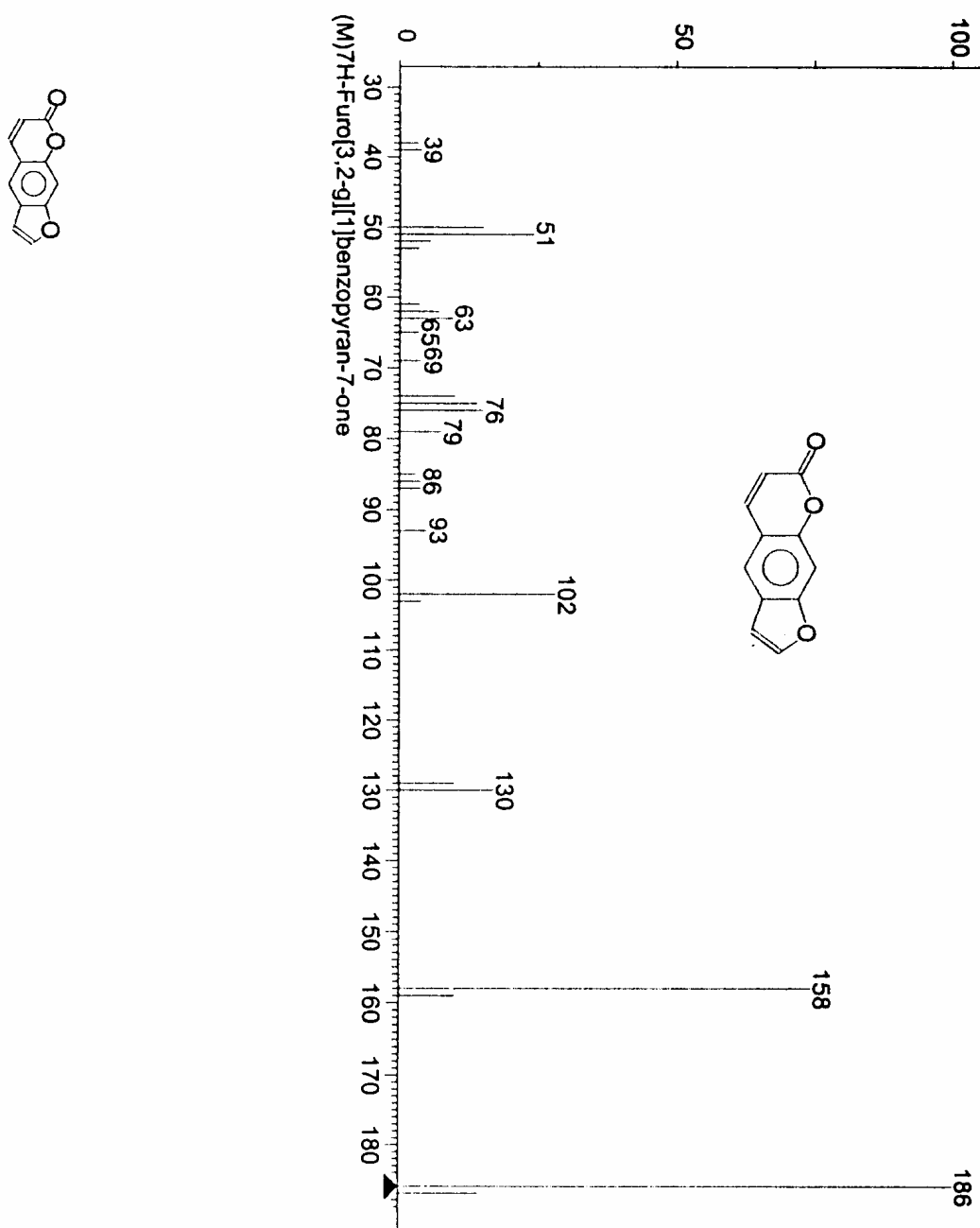
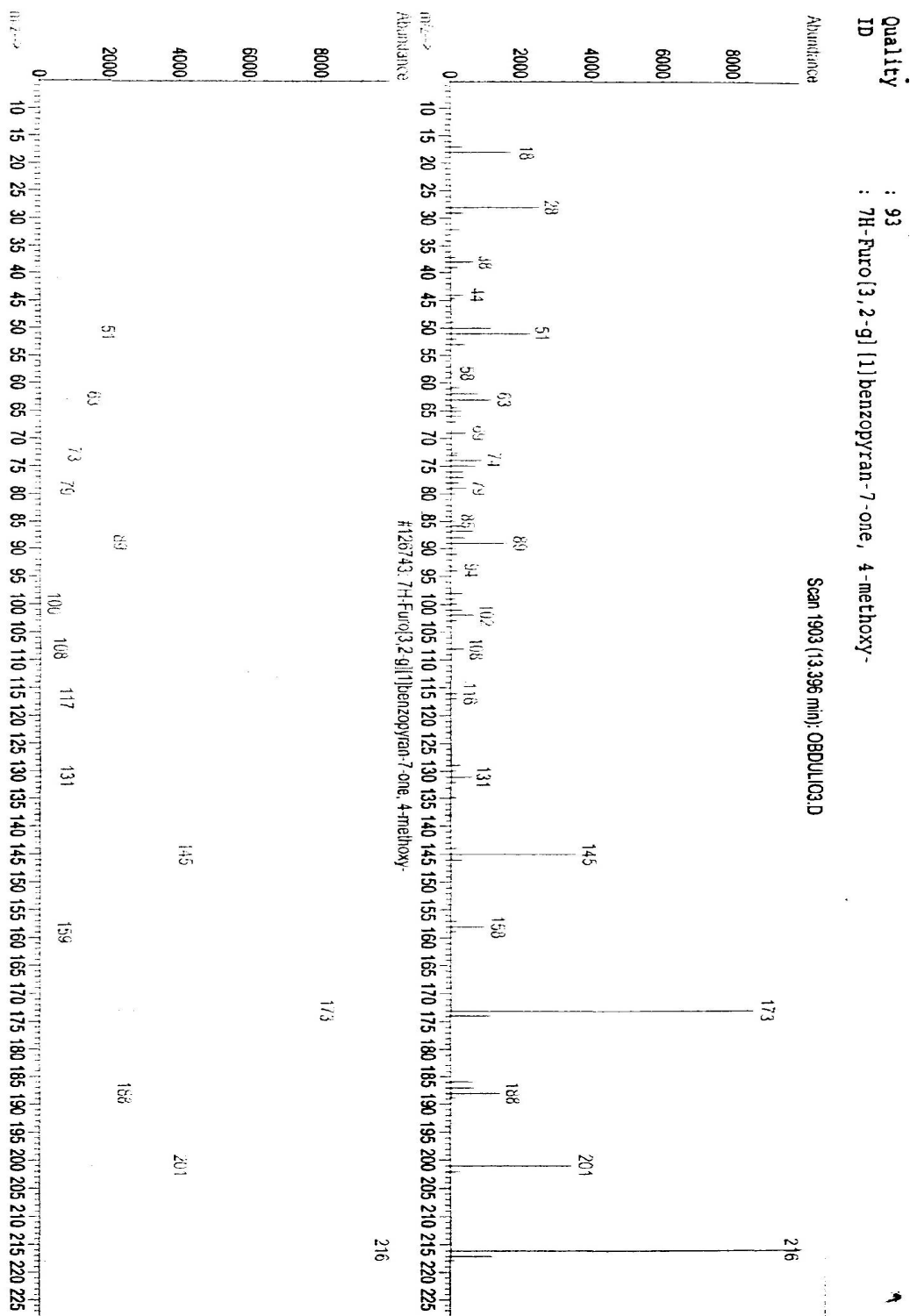


FIGURA 20 - CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A MASSA DA AMOSTRA CRS1  
PARA BERGAPTENO DATABASE/NIST1998



### 5.5.2 Ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio da amostra CRS1

O espectro de  $^{13}\text{C}$  foi obtido em 50MHZ , apresentado na figura 21 e figura 22, respectivamente; estes revelaram absorções que estão demonstradas na tabela 6. A referida tabela apresenta absorções referentes à estrutura química do psoraleno e na tabela 7 respectivamente tem-se as absorções referentes a estrutura compatível com o bergapteno abaixo apresentada.

TABELA 6 - DESLOCAMENTOS EM ppm DO ESPECTRO DE RMN -  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  PARA SUBSTÂNCIA ISOLADA PSORALENO, DA AMOSTRA CRS1

| CARBONO | TIPO | ABSORÇÃO (ppm) | PROTON                         |
|---------|------|----------------|--------------------------------|
| 1       |      |                |                                |
| 2       | CH   | 160,86         |                                |
| 3       | CH   | 112,18         | (5,58-5,78)<br>( 1H.d. H3)     |
| 4       | CH   | 139,15         | (7,71- 7,66)<br>( 1H.d.9.2.H4) |
| 5       | CH   | 144,62         |                                |
| 6       | C    | 104,9          |                                |
| 7       | C    | 156,19         |                                |
| 8       | CH   | 93,46          | (7.16)<br>(1H.S.H.8)           |
| 9       | C    | 151,79         |                                |
| 10      | C    | 112,18         |                                |
| 1"      | CH   | 104,9          | 6,40 (1H.d.H2")                |

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS, EM ppm, DE RMN DE -  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  PARA SUBSTÂNCIA ISOLADA DA AMOSTRA CRS1, BERGAPTEÑO

| CARBONO | TIPO  | ABSORÇÃO (ppm) | PROTON                      |
|---------|-------|----------------|-----------------------------|
| 1       |       |                |                             |
| 2       | CH    | 160,86         | (5,58-5,78)                 |
| 3       | CH    | 112,18         | ( 1H.d. H3)<br>(7,71- 7,66) |
| 4       | CH    | 139,15         | ( 1H.d.9.2.H4)              |
| 5       | CH    | 144,62         |                             |
| 6       | C     | 104,9          |                             |
| 7       | C     | 156,19         | (7.16)                      |
| 8       | CH    | 93,46          | (1H.S.H.8)                  |
| 9       | C     | 151,79         |                             |
| 10      | C     | 112,18         |                             |
| 1"      | CH    | 104,9          | 6,40 (1H.d.H2")             |
| 2"      | CH    | 143,9          | (6,62-6,59) (1H.d.H2")      |
|         | O-CH3 | 59,88          | 3,83(S,3H.J.9,34)           |

Comparando-se os dados do espectro aos valores relatados pela literatura para psoraleno na tabela 6 e bergapteno tabela 7 sugere-se que a estrutura majoritária seja o psoraleno figura 19, sendo que os sinais excedentes no espectro são coincidentes para a estrutura química do bergapteno.

Os principais deslocamentos referentes ao carbono estão no espectro figura 21 de RMN $^{13}\text{C}$  ( 50 MHZ em  $\text{CDCl}_3$  ) para os compostos denominados psoraleno e bergapteno. Na figura 22 encontram-se os deslocamentos referentes ao RMN  $^1\text{H}$  (50MHZ em  $\text{CDCl}_3$ ) também para ambos os compostos isolados da amostra CRS1.

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) PARA O PSORALENO E BERGAPTENO

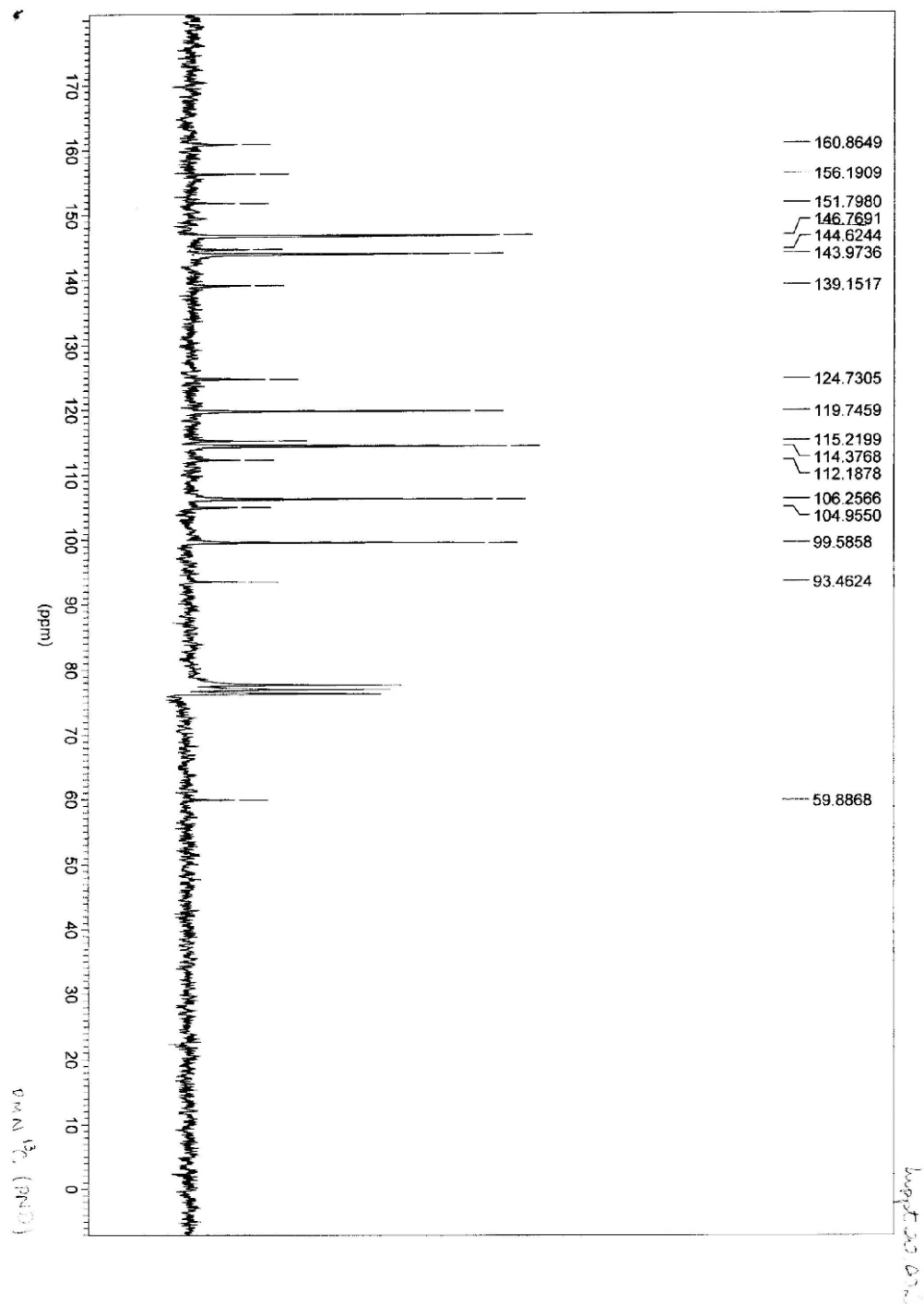
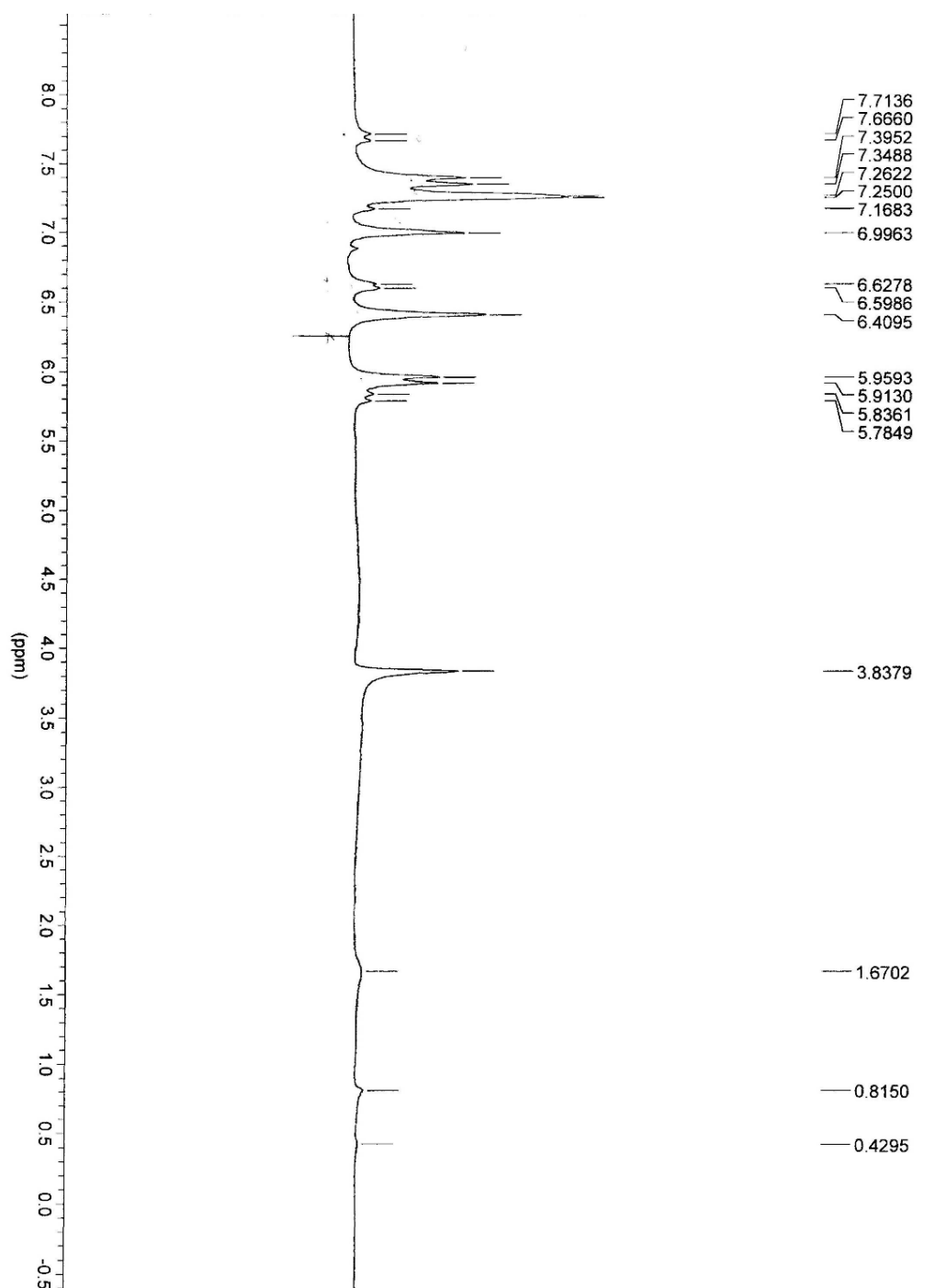


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( 50 MHZ em  $\text{CDCl}_3$ ) PARA O PSORALENO E BERGAPTENO



Na figura 23 que segue abaixo, apresenta-se a expansão do próton  $^1\text{H}$  na faixa de deslocamento entre 5,6 e 7,8 ppm para o psoraleno e bergapteno como demonstrado na tabela 7.



FIGURA 23 – ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN  $^1\text{H}$  PARA COMPOSTOS ISOLADOS DA AMOSTRA CRS1

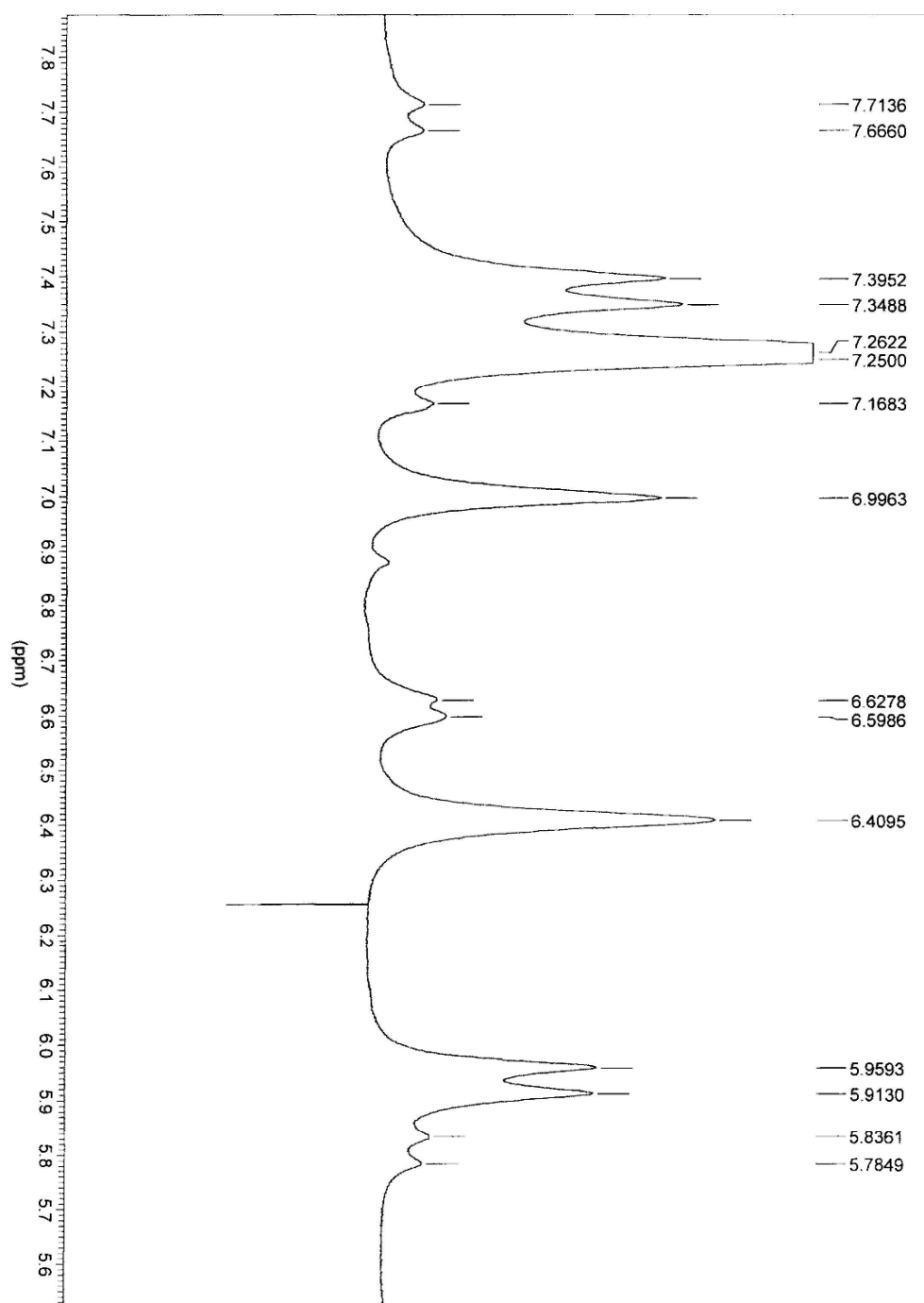
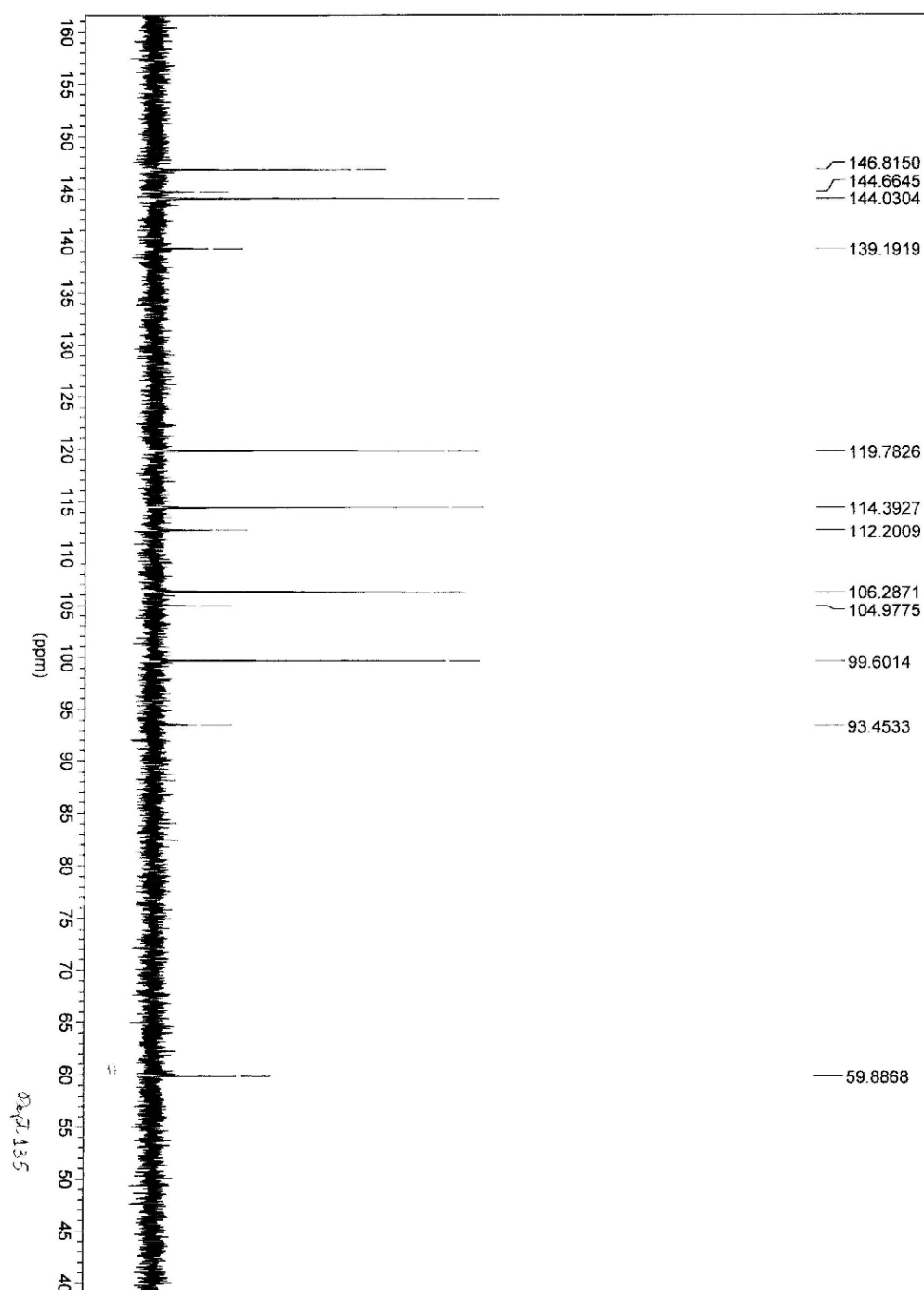


FIGURA 24 – ESPECTRO RMN  $^{13}\text{C}$  REFERENTE À AMOSTRA CRS2

Na figura 24, apresenta-se o cromatograma do Dept correspondente à amostra CRS2. Este demonstra não haver ligação  $\text{CH}_2$  na amostra em análise.

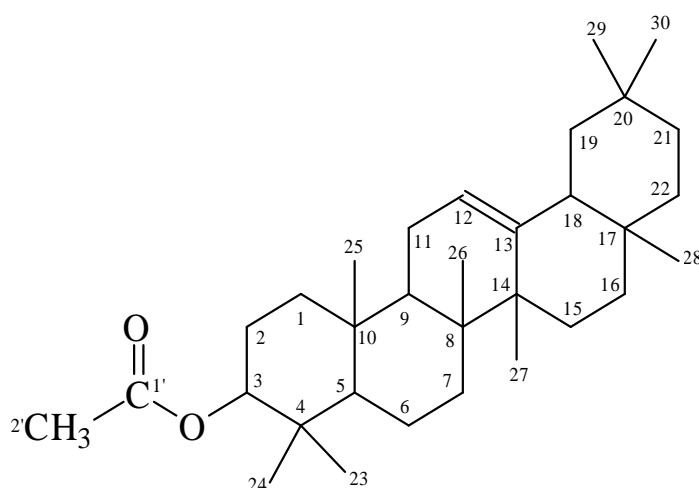
TABELA 8 - VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE RMN DE  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}/^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\Delta$ ) PARA A AMOSTRA CRS2

| C    | $^{13}\text{C} - \delta_{\text{C}} - (\alpha)$ | $^1\text{H} - \delta_{\text{H}} (\alpha)$ | $^{13}\text{C} - \delta_{\text{C}} - (\beta)$ | $^1\text{H} - \delta_{\text{H}} - (\beta)$ | $\alpha$ Amirina | $\beta$ Acetil |
|------|--|---|---|--|------------------|----------------|
| 1    | 38.45  |   | 38.45   |  | 38.7             | 38.7           |
| 2    | 28.02  |   | 28.74   |  | 27.2             | 27.3           |
| 3    | 80.61  | 4.49 (dd, H)                              | 80.61   | 4.49 (dd, H)                               | 78.3             | 79.0           |
| 4    | 38.04  |   | 38.25   |  | 38.7             | 38.8           |
| 5    | 55.24  |   | 55.24   |  | 55.2             | 55.3           |
| 6    | 18.10  |   | 18.25   |  | 18.3             | 18.5           |
| 7    | 32.97  |   | 32.85   |  | 32.9             | 32.8           |
| 8    | 40.02  |   | 38.45   |  | 40.0             | 38.8           |
| 9    | 47.54  |   | 47.63   |  | 47.7             | 47.7           |
| 10   | 36.78  |   | 37.70   |  | 36.9             | 37.6           |
| 11   | 23.36  |   | 23.58   |  | 23.3             | 23.6           |
| 12   | 124.31   | 5.12 (dd, H)                              | 121.63  | 5.12 (dd, H)                               | 124.3            | 121.8          |
| 13   | 139.19   |   | 145.20  |  | 139.3            | 145.1          |
| 14   | 42.05  |   | 41.70   |  | 42.0             | 41.8           |
| 15   | 28.74  |   | 26.12   |  | 28.7             | 26.2           |
| 16   | 26.92  |   | 26.59   |  | 26.6             | 27.0           |
| 17   | 33.74  |   | 32.58   |  | 33.7             | 32.5           |
| 18   | 59.04  |   | 47.54   |  | 58.9             | 47.4           |
| 19   | 39.64  |   | 28.02   |  | 39.6             | 46.9           |
| 20   | 39.60  |   | 31.07   |  | 39.6             | 31.1           |
| 21   | 31.24  |   | 34.72   |  | 31.2             | 34.8           |
| 22   | 41.53  |   | 37.13   |  | 41.5             | 37.2           |
| 23   | 27.98  | 1.01 (d, $\text{CH}_3$ )                  | 28.05   | 1.01 (d, $\text{CH}_3$ )                   | 28.1             | 28.2           |
| 24   | 15.72  | 1.11 (d, $\text{CH}_3$ )                  | 15.54   | 1.11 (d, $\text{CH}_3$ )                   | 15.6             | 15.5           |
| 25   | 16.16  | 0.92 (s, $\text{CH}_3$ )                  | 15.96   | 0.89 (s, $\text{CH}_3$ )                   | 15.6             | 15.6           |
| 26   | 16.80  | 1.05 (s, $\text{CH}_3$ )                  | 16.85   | 0.96 (s, $\text{CH}_3$ )                   | 16.8             | 16.9           |
| 27   | 23.21  | 1.24 (s, $\text{CH}_3$ )                  | 25.93   | 12,4 (s, $\text{CH}_3$ )                   | 23.3             | 26.0           |
| 28   | 28.08  | 0.79 (s, $\text{CH}_3$ )                  | 28.39   | 0.78 (s, $\text{CH}_3$ )                   | 28.1             | 28.4           |
| 29   | 17.48  | 0.99 (s, $\text{CH}_3$ )                  | 33.32   | 0.95 (d, $\text{CH}_3$ )                   | 17.4             | 33.3           |
| 30   | 21.38  | 0.81 (s, $\text{CH}_3$ )                  | 23.68   | 0.85 (d, $\text{CH}_3$ )                   | 21.3             | 23.7           |
| 1'   | 170.99<br>(C=O)                                |   | 170.99<br>(C=O)                               |  |                  | 170.9<br>9     |
| 2'   | 21.38 ( $\text{CH}_3$ )                        | 2.034<br>(s, $\text{H}_3\text{CCO}$ )     | 21.38 ( $\text{CH}_3$ )                       | 2.034<br>(s, $\text{H}_3\text{CCO}$ )      |                  | 21.38          |
| Ref. |  |   |   |  | [3]              | [2] [1, 4]     |

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  observa-se o perfil característico de triterpenos, conforme tabela 8. A presença de 10 metilas singleto e seis metilas duplete no espectro de próton é confirmada no carbono-13 (figuras 27, 28, 29 e 30), sugerindo um esqueleto pentacíclo derivado do ursano e lanostano contendo uma ligação dupla trissubstituída definida pelos sinais de próton em 5,12 ppm H,

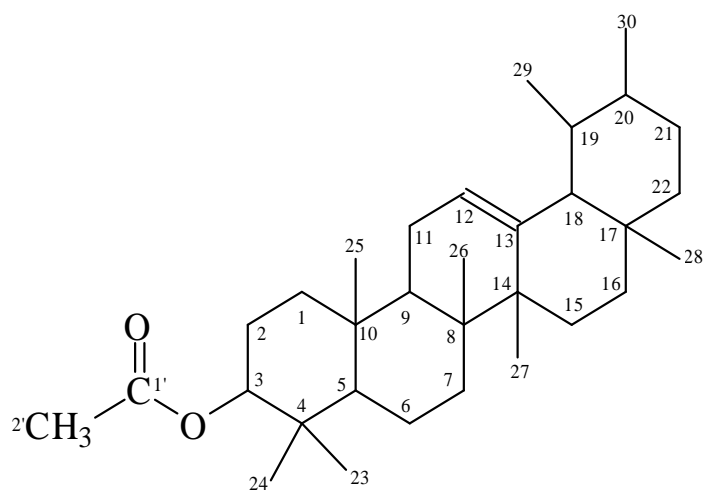
e carbono em 124,1 e 121,7 ppm CH e 139,4 e 145,1 ppm para C (figuras 31 e 32). O duplo duplete centrado em 4.49 ppm para um próton carbinólico correlacionado ao CH em 80,61 indicam a presença do 3 $\beta$ -acetato. A comparação dos deslocamentos químicos de carbono-13 com dados da literatura (GALLEGOS, OLEA e NÍDIA, 1990 ; KNIGHT e RESON, 1974; SEO, TOMITA e TORI, 1981, e BARRETO *et al.*, 1998) permitiu identificar os triterpenos 3 $\beta$ -O-acetato de  $\beta$  amirina e 3 $\alpha$ -O-acetato de  $\alpha$  amirina, cujos valores de deslocamento apresentam-se descritos no quadro 3 e figuras 23 e 24.

FIGURA 25 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ALFA AMIRINA



## 2. Alfa amirina ( 3 $\alpha$ -O-acetato de $\alpha$ amirina)

FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BETA AMIRINA



3. Beta amirina (3  $\beta$  amirina -O-acetato  $\beta$  amirina )

FIGURA 27 - ESPECTRO de RMN  $^{13}\text{C}$  DA AMOSTRA CRS2 DE 3 $\alpha$ -O-acetato de  $\alpha$  amirina e 3  $\beta$  amirina -O-acetato  $\beta$  amirina

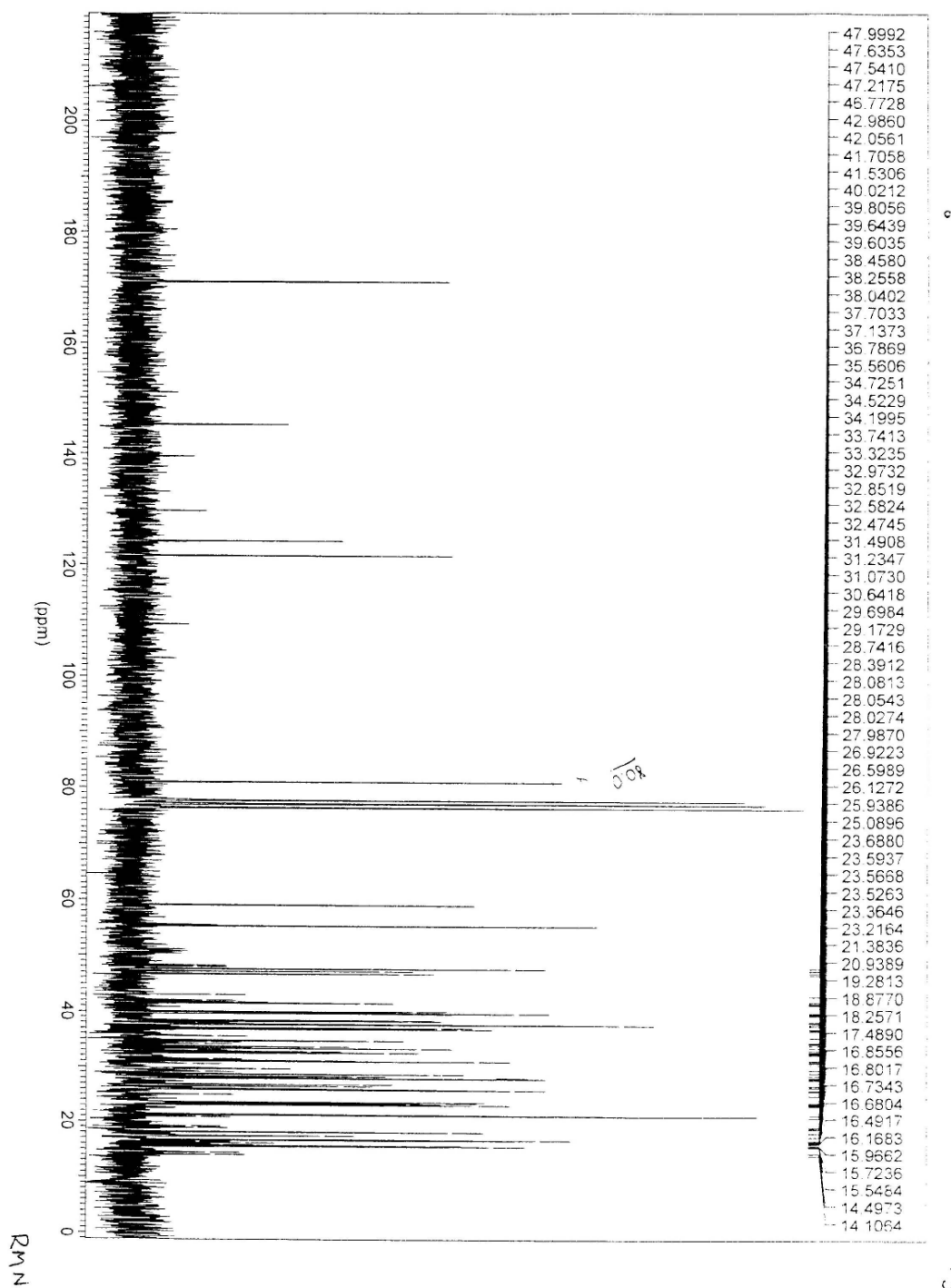


FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  EXPANSÃO REFERENTE DE 14 A 33 ppm PARA AMOSTRA CRS2 DE 3 $\alpha$ -O-acetato de  $\alpha$  amirina e 3  $\beta$  amirina -O-acetato  $\beta$  amirina

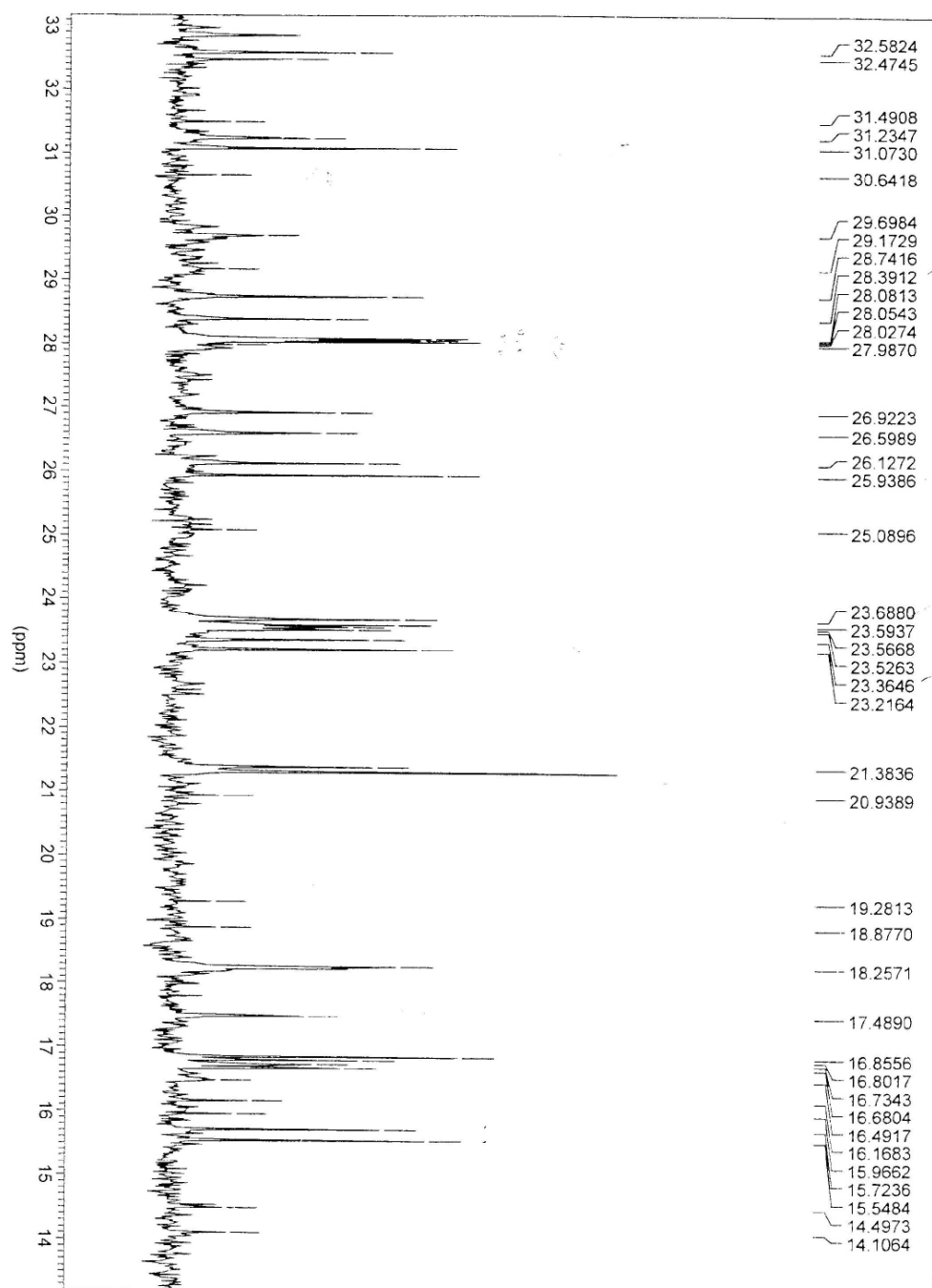


FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  EXPANSÃO REFERENTE DE 32 A 60 ppm PARA AMOSTRA CRS2 DE 3 $\alpha$ -O-acetato de  $\alpha$  amirina e 3  $\beta$  amirina -O-acetato  $\beta$  amirina

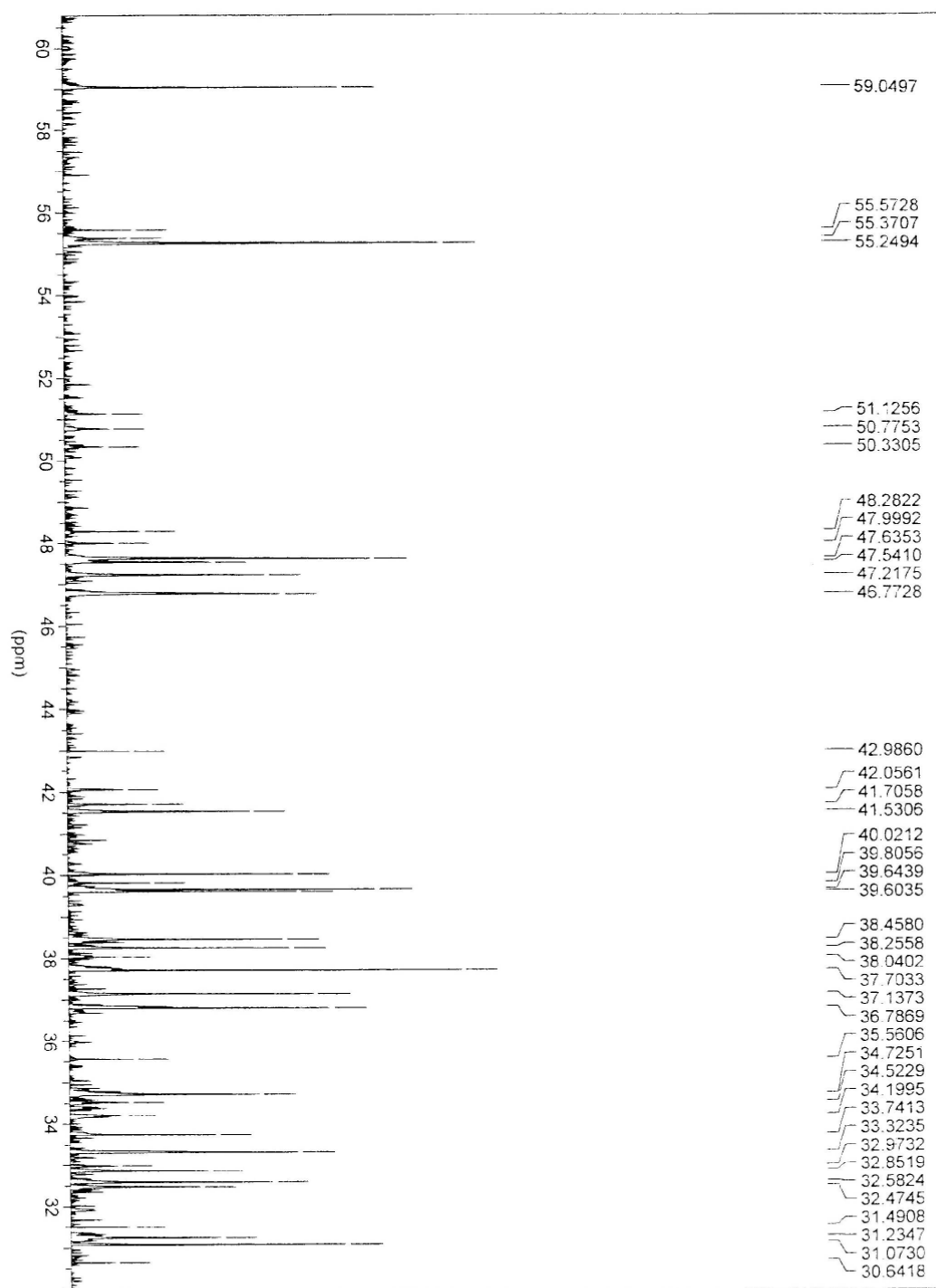




FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  EXPANSÃO REFERENTE DE 95 A 190 ppm PARA FRAÇÃO CRS2 DE  $3\alpha$ -O-acetato de  $\alpha$  amirina e  $3\beta$  amirina -O-acetato  $\beta$  amirina

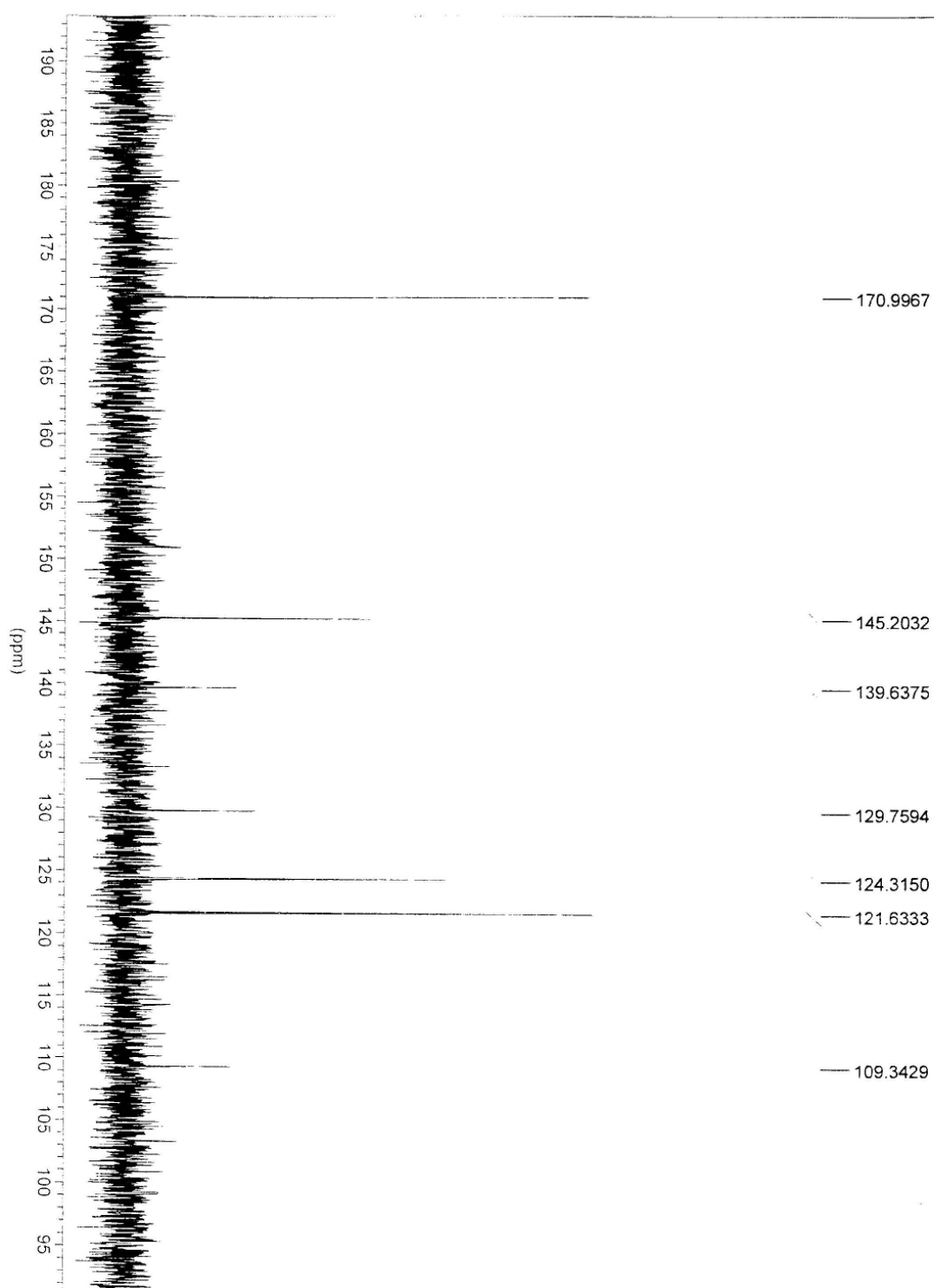


FIGURA 31 – ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN –  $^1\text{H}$  NA FAIXA DE 0,0 A 7,5 ppm DA AMOSTRA CRS2 CORRESPONDENTE A  $3\alpha$  - O - acetato de  $\alpha$  amirina e  $3\beta$  amirina - O - acetato  $\beta$  amirina

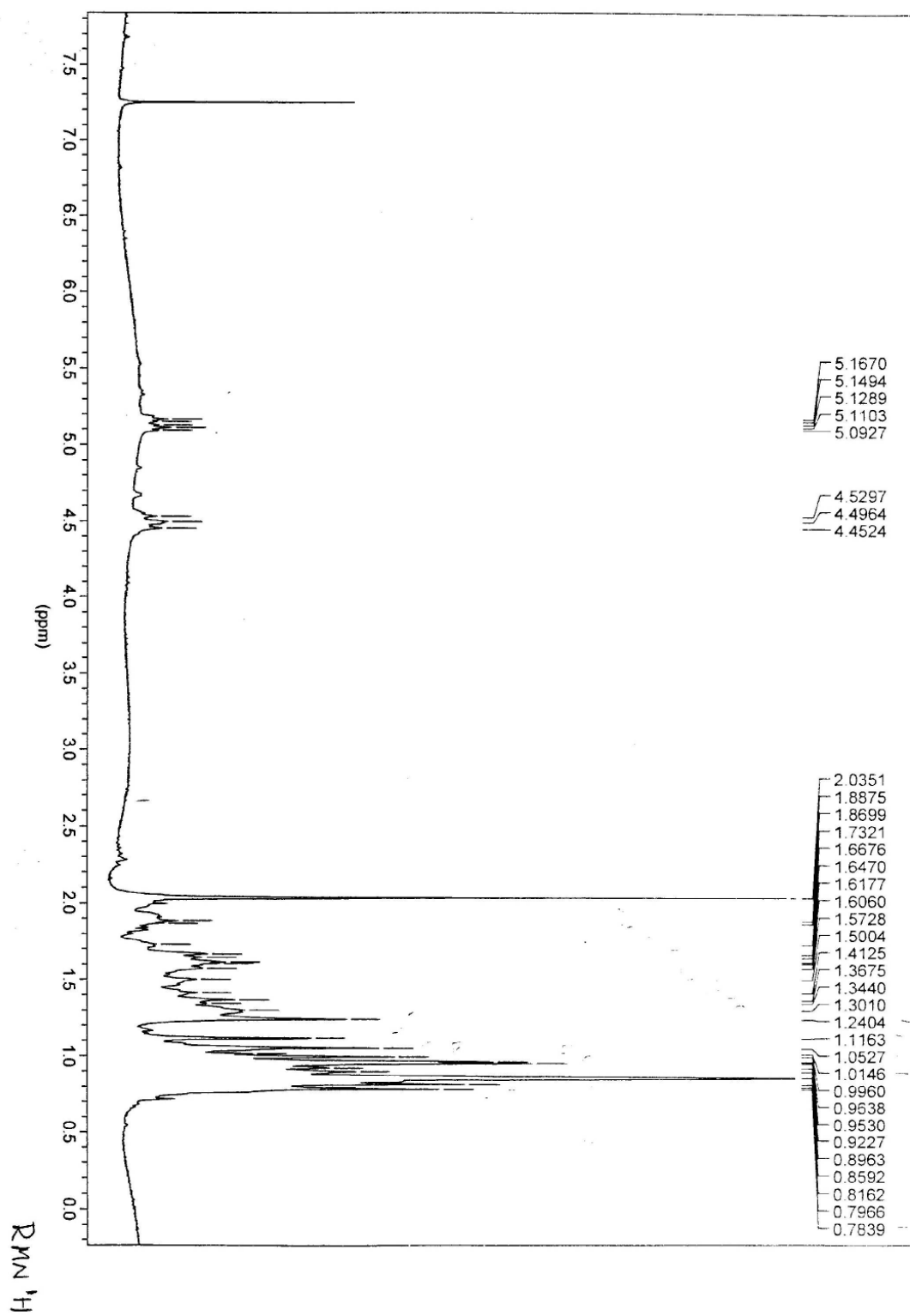
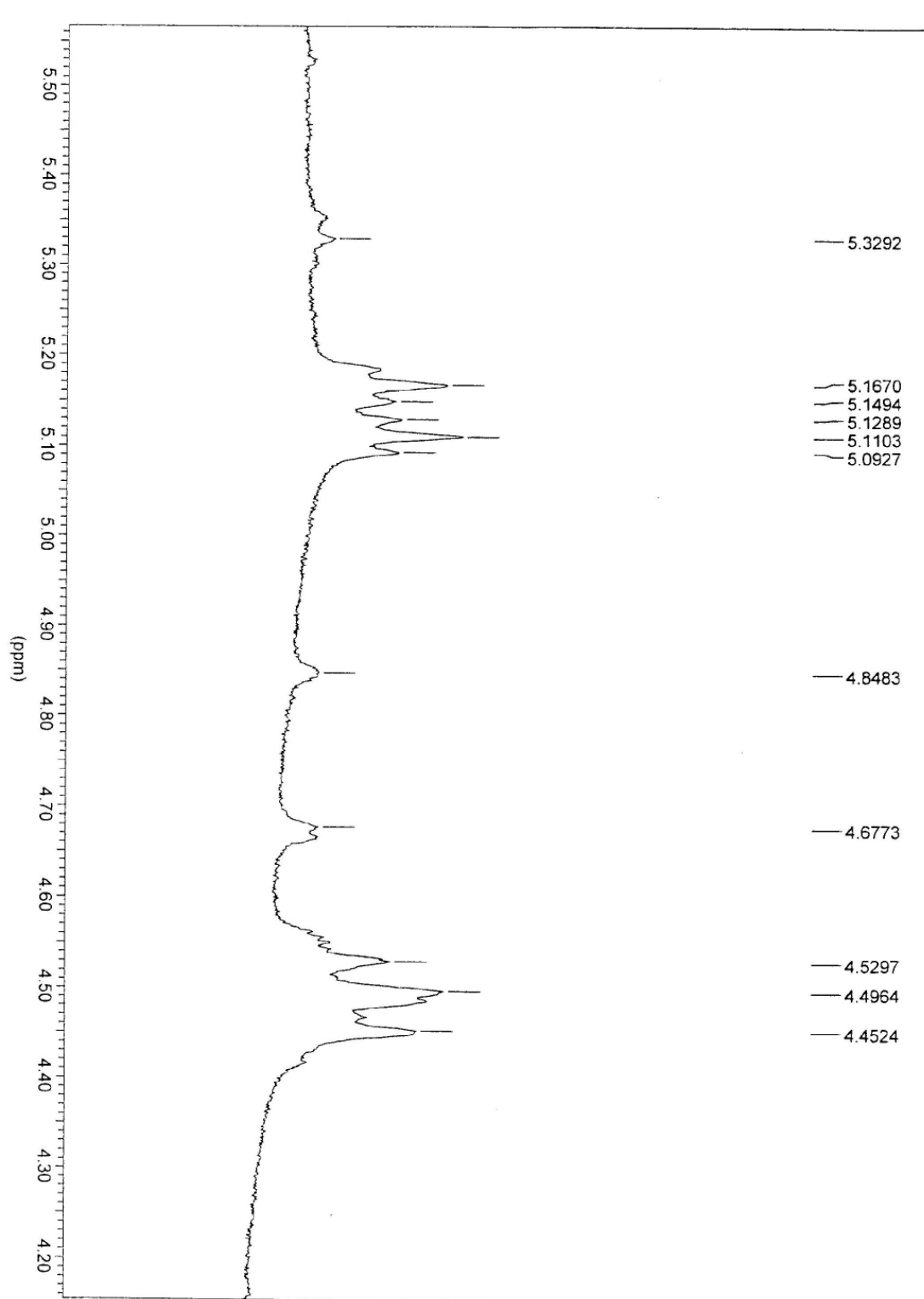


FIGURA 32 – ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN  $^1\text{H}$  NA FAIXA DE 4,20 a 5,50 REFERENTE A CRS2 DE 3 $\alpha$ -O-acetato de  $\alpha$  amirina e 3  $\beta$  amirina -O-acetato  $\beta$  amirina



## 5.6 CROMATOGRAMA DA AMOSTRA CRS1 EM CLAE UTILIZANDO COMO PADRÃO PSORALENO E BERGAPTENO

No cromatograma por CLAE utilizou-se psoraleno e bergapteno na concentração de 0,1mg/mL (figura 33). Por este cromatograma observou-se a concentração de Psoraleno 90mg e a concentração de bergapteno 9,0mg, cuja relação encontra-se apresentada na tabela 10, confirmando que na amostra CRS1 foi identificado como o composto majoritário o psoraleno.

FIGURA 33 - CROMATOGRAMA POR CLAE DA FRAÇÃO CRS1

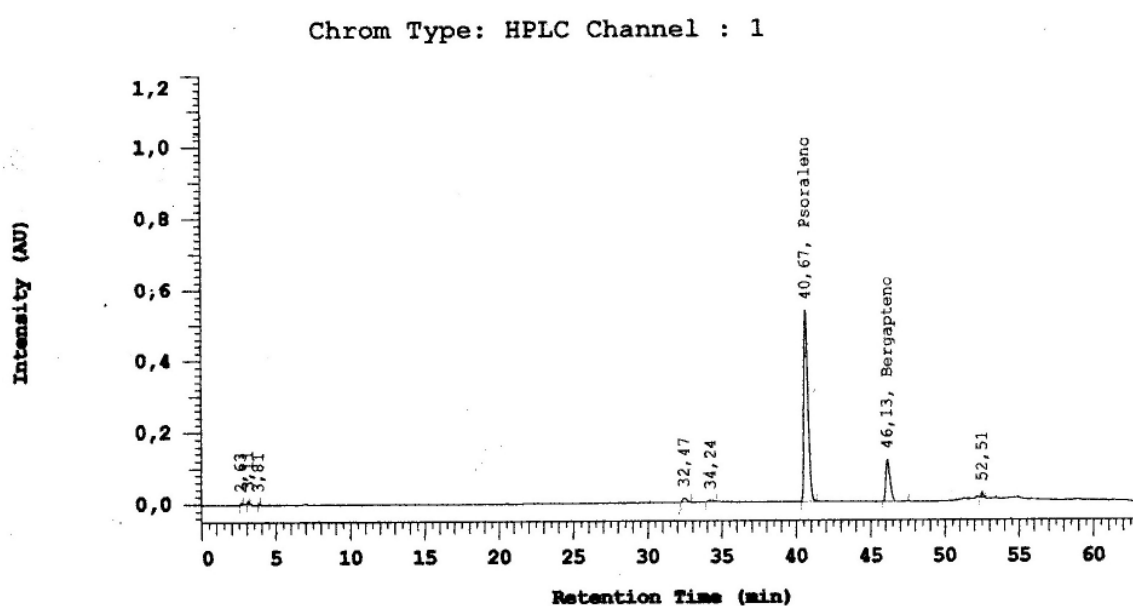


TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO CRS1

Peak Quantitation: AREA  
Calculation Method: EXT-STD

| No. | RT    | Area    | Conc 1<br>mg/mL | Name       |
|-----|-------|---------|-----------------|------------|
| 6   | 40,67 | 4982797 | 0,0902900       | Psoraleno  |
| 7   | 46,13 | 1099226 | 0,00971000      | Bergapteno |
|     |       | 6082023 | 0,100000        |            |

Peak rejection level: 0

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada para o extrato etanólico bruto e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila.

### 5.7.1 Difusão em ágar

Os resultados da atividade antibacteriana de difusão em gel dos controles (metanol, cefalotina e cloranfenicol) e das amostras testadas (extrato etanólico bruto e frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de *Dorstenia multiformis*) estão apresentados na tabela 10.

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Dorstenia multiformis*, POR DIFUSÃO EM AGAR

| MÉDIA DO DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO EM mm |        |      |      |      |      |      |      |      |   |
|---|--------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| CONCENTRAÇÕES                                 | Ec     | Kp   | Pm   | Pa   | St   | Sa   | Se   | Sp   |   |
| EEB   | 100,0% | 0    | 7,0  | 0    | 0    | 8,0  | 7,0  | 0    | 0 |
|   | 50,0%  | 0    | 7,0  | 0    | 0    | 7,0  | 7,0  | 0    | 0 |
|   | 25,0%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 7,0  | 0    | 0 |
|   | 12,5%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 7,0  | 0    | 0 |
| Controle cefalotina (30µg)                    | 0      | 25,5 | 11,0 | 0    | 26,0 | 49,5 | 40,0 | 44,5 |   |
| Controle cloranfenicol (30µg)                 | 32,5   | 30,0 | 27,5 | 30,0 | 35,5 | 33,5 | 37,5 | 34,5 |   |
| Controle metanol                              | 0      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |
| FH  | 100,0% | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 8,0  | 0 |
|   | 50,0%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 8,0  | 0 |
|   | 25,0%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 7,0  | 0 |
|   | 12,5%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 7,0  | 0 |
| Controle cefalotina (30µg)                    | 0      | 23,2 | 11,0 | 0    | 29,0 | 48,3 | 35,0 | 44,5 |   |
| Controle cloranfenicol (30µg)                 | 32,8   | 33,0 | 27,5 | 30,0 | 37,0 | 35,0 | 39,5 | 35,0 |   |
| Controle metanol                              | 0      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |
| FC  | 100,0% | 0    | 7,0  | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 8,0  | 0 |
|   | 50,0%  | 0    | 7,0  | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 8,0  | 0 |
|   | 25,0%  | 0    | 7,0  | 0    | 0    | 0    | 7,0  | 0    | 0 |
|   | 12,5%  | 0    | 7,0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0 |
| Controle cefalotina (30µg)                    | 0      | 21,0 | 11,5 | 0    | 29,3 | 48,0 | 35,4 | 44,5 |   |
| Controle cloranfenicol (30µg)                 | 32,5   | 32,1 | 24,5 | 29,0 | 35,5 | 34,0 | 38,1 | 34,5 |   |
| Controle metanol                              | 0      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |
| FAE   | 100,0% | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0 |
|   | 50,0%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0 |
|   | 25,0%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0 |
|   | 12,5%  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0 |
| Controle cefalotina (30µg)                    | 0      | 25,5 | 12,0 | 0    | 29,0 | 49,5 | 48,0 | 43,5 |   |
| Controle cloranfenicol (30µg)                 | 33,8   | 34,0 | 27,5 | 30,0 | 33,0 | 37,5 | 35,5 | 34,8 |   |
| Controle metanol                              | 0      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |

NOTA: EEB = Extrato etanólico bruto; FH = Fração hexano; FCF = Fração clorofórmio; FAE = Fração acetato de etila; Ec = *Escherichia coli*; Kp = *Klebsiella pneumoniae*; Pm = *Proteus mirabilis*; Pa = *Pseudomonas aeruginosa*; St = *Salmonella typhimurium*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Se = *Staphylococcus epidermidis*; Sp = *Streptococcus pyogenes*.

Os resultados apresentados mostram atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto e frações hexano e clorofórmio sobre *Staphylococcus aureus*, em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração 12,5% para a fração clorofórmio.

O *Staphylococcus aureus* é conhecido por causar infecções como endocardite, pneumonia e ocasionalmente a meningite (TRABULSI, 1999).

A bactéria *Staphylococcus epidermidis* sofreu inibição do crescimento em presença das frações hexano (em todas as concentrações testadas) e clorofórmio (nas maiores concentrações – 100 e 50%).

O *Staphylococcus epidermidis* tem sido isolado de infecções associadas à implantação de próteses cardíacas, articulares e vasculares, e em endocardites (TRABULSI, 1999).

Observa-se também influência inibitória do extrato bruto sobre as bactérias *Salmonella typhimurium* (em todas as concentrações testadas) e *Klebsiella pneumoniae* (nas maiores concentrações – 100 e 50%), sendo esta última bactéria também inibida em presença da fração clorofórmio em todas as concentrações testadas.

As enterobactérias *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae* são agentes etiológicos das enterocolites, que são processos infecciosos também denominados intoxicação alimentar (TRABULSI, 1999).

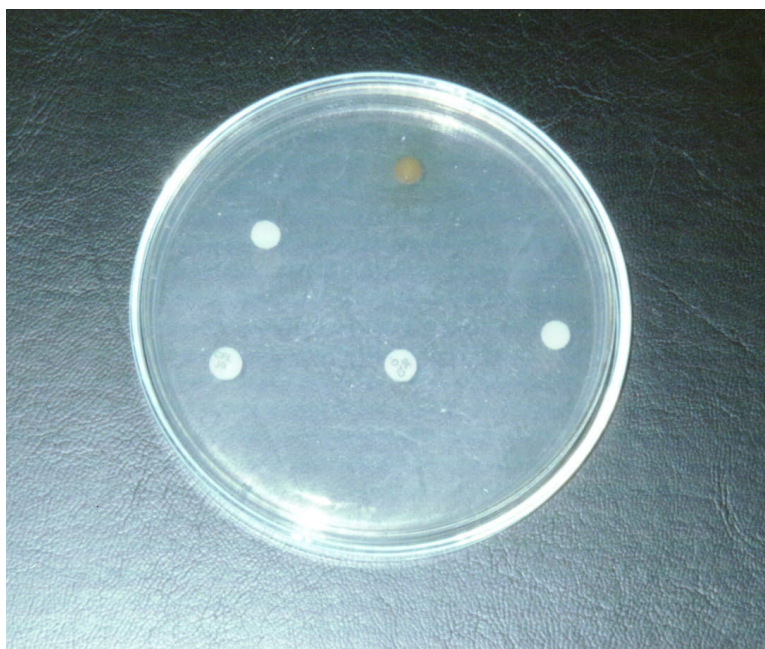
A ausência de halo de inibição é interpretada como ausência de atividade antimicrobiana para a amostra em questão sobre determinada bactéria.

O resultado negativo apresentado pelos microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* para o controle cefalotina é devido à resistência destes frente à cefalotina, ou seja, houve aparecimento de colônias no halo de inibição.

A hidrofília dos constituintes químicos é determinante para a difusão no meio de cultura utilizado, uma vez que, segundo ROMEIRO (2001), um meio semi-sólido, o qual contenha ágar como agente solidificante, é definido como um gel perfeito. Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos para o teste de difusão em gel, presume-se que a maioria dos constituintes químicos presentes nas amostras testadas apresentam características lipofílicas, dificultando sua difusão no meio de cultura e, conseqüentemente, o contato

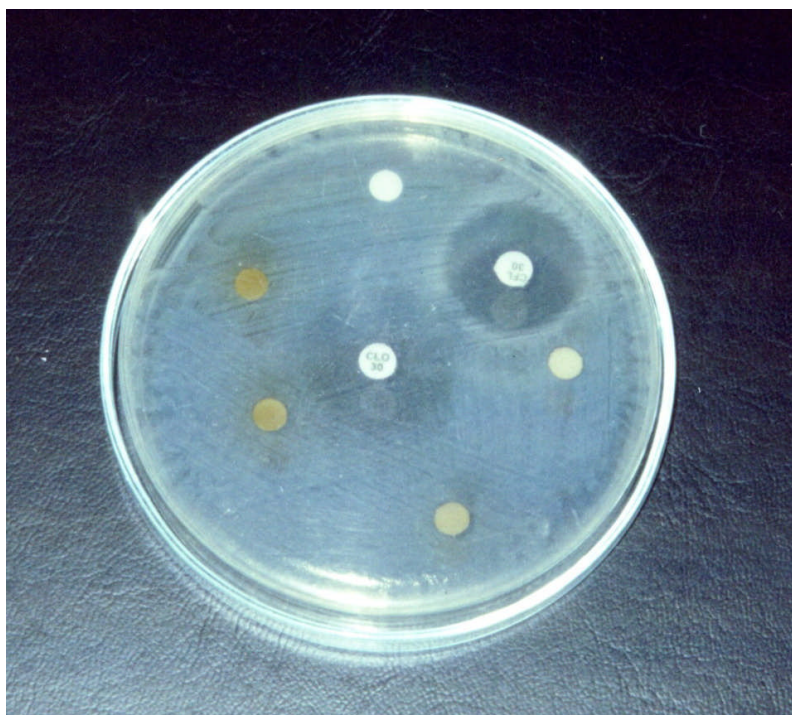
com a bactéria inoculada no meio. Este fato pode explicar a ausência de halos de inibição na maioria das amostras testadas, bem como a formação de pequenos halos para algumas amostras. Deve-se desconsiderar a possibilidade de ocorrência de problemas com o método, uma vez que os padrões apresentaram resultados dentro do esperado (halos de inibição) e o controle (metanol) não apresentou crescimento – demonstrando que a presença de metanol não exerce influência sobre a atividade das amostras testadas.

FIGURA 34 – CONTROLE DE ESTERILIDADE DO ENSAIO



Como pode-se observar na figura 34, os antibióticos controle e as amostras, bem como o solvente utilizado nas diluições, encontram-se em condições estéreis, demonstrando não haver crescimento bacteriano em meio de cultura sem inóculo.



FIGURA 35 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO PARA *S. aureus*

#### 5.7.2 Concentração inibitória mínima (MIC)

Os resultados dos testes de MIC estão apresentados na figura 36. A última diluição em que não houve crescimento de microrganismo foi considerada a concentração mínima da amostra capaz de inibir o desenvolvimento da bactéria em questão.

A inibição mais expressiva foi relativa à fração hexano sobre a bactéria *Escherichia coli*, onde observou-se ausência de crescimento bacteriano, por comparação com o controle negativo de crescimento (meio de cultura e amostra), no tubo de maior concentração da fração hexano, ou seja, na diluição 1:1. Considere-se que a baixa polaridade dos compostos da fração hexano diminui a velocidade de difusão no ágar em relação aos antibióticos controle que são polares e ao extrato bruto, o que explica a ausência dessa atividade no teste de difusão em ágar.

Os esteróides e triterpenos comumente presentes nas plantas estão concentrados geralmente na fração mais apolar, neste caso a fração hexano, e

são conhecidos por diversas atividades de interesse biológico, dentre as quais a atividade antimicrobiana. Substâncias como o  $\beta$ -sitosterol, a  $\alpha$ -amirina e lupeol demonstraram atividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SINGH; SINGH, 2003) e segundo JAIN, JAIN e SINGH (2003) a  $\alpha$ -amirina (0,29%) demonstrou a maior atividade entre os triterpenos presentes na *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. contra a *E. coli*.

Observou-se, ainda, no teste de concentração inibitória mínima, atividade moderada contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, para todas as amostras testadas, e uma fraca atividade contra as bactérias *Escherichia coli* (extrato bruto e frações clorofórmio e acetato de etila), *Klebsiella pneumoniae*, para todas as amostras testadas, *Salmonella thyphimurium* (extrato bruto e fração hexano) e *Streptococcus pyogenes* (extrato bruto e frações hexano e acetato de etila). Todas as atividades no teste de concentração inibitória mínima ocorreram com a maior concentração da amostra testada (diluição 1:1).

TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Dorstenia multiformis* – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

| AMOSTRA                     | MICRORGANISMOS |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                             | Ec             | Kp  | Pm  | Pa  | St  | Sa  | Se  | Sp  |
| FRAÇÃO HEXANO               | NEG            | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
|                             | (1:1)          |     |     |     |     |     |     |     |
| Controle dos Microrganismos | +              | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |

NOTA: + = crescimento de microrganismos em meio de cultura isento de material testado; NEG. = resultado negativo, nenhuma concentração inibiu o crescimento de microrganismos.

FIGURA 36 – FOTOGRAFIA DO MIC PARA A FRAÇÃO HEXANO



## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Submeteram-se a este estudo amostras do extrato etanólico, frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e controles.

### 5.8.1 Avaliação da germinação

Observa-se diferença estatística, nas maiores concentrações utilizadas, para o extrato etanólico bruto e frações hexano e clorofórmio, ao comparar com o respectivo controle (tabela 12). Com os resultados apresentados, há indicação de influência inibitória do extrato etanólico e frações hexano e clorofórmio sobre a germinação de *Lactuca sativa*, nas concentrações de 0,6; 0,4 e 0,1mg do extrato bruto etanólico; 0,6; 0,4; 0,3; 0,2 e 0,1mg da fração hexano; e 0,6; 0,4; 0,3 e 0,1mg da fração clorofórmio.

TABELA 12 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALEOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Dorstenia multiformis*

| EXTRATO/<br>FRAÇÃO  | CONCENTRAÇÃO |        |        |        |        |            |             | CONTROLE<br>ÁGUA<br>DESTILADA |
|---------------------|--------------|--------|--------|--------|--------|------------|-------------|-------------------------------|
|                     | 0,6 mg       | 0,4 mg | 0,3 mg | 0,2 mg | 0,1 mg | 0,05<br>mg | 0,025<br>mg |                               |
| EXTRATO             | 6,8750       | 6,8325 | 9,0000 | 8,3750 | 8,1250 | 8,6250     | 8,3750      |                               |
| BRUTO               | d            | d      | g      | g      | f      | g          | g           |                               |
| ETANÓLICO           |              |        |        |        |        |            |             | 8,8325 g                      |
| FRAÇÃO              | 5,0400       | 5,6650 | 6,1250 | 6,1025 | 7,5000 | 8,7500     | 8,6250      |                               |
| HEXANO              | a            | b      | c      | c      | e      | g          | g           |                               |
| FRAÇÃO              | 4,2500       | 4,1425 | 4,1650 | 3,6650 | 4,1525 | 4,4850     | 4,4225      |                               |
| CLOROFÓR<br>MIO     | b            | b      | b      | a      | b      | c          | c           | 4,7136 c                      |
| FRAÇÃO              | 4,6225       | 4,3625 | 4,6425 | 4,9375 | 4,6650 | 4,4350     | 4,5255      |                               |
| ACETATO<br>DE ETILA | c            | c      | c      | c      | c      | c          | c           |                               |

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si.

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que a influência alelopática inibitória sobre a germinação ocorreu nas maiores concentrações para todas as amostras que apresentaram essa atividade, com exceção da concentração 0,1mg do extrato bruto etanólico e da fração clorofórmio.

Assim sendo, considere-se que as interferências alelopáticas raramente são provocadas por uma única substância, sendo mais comum que o efeito se deva a um conjunto delas. Basicamente, reconhece-se que os agentes aleloquímicos presentes em uma espécie podem afetar diversas funções como: a absorção de nutrientes, a regulação do crescimento, a fotossíntese, a respiração, a permeabilidade da membrana, a síntese protéica e a atividade enzimática. Considere-se ainda que o fato de uma mesma substância afetar diversas funções fisiológicas da planta, assim como a constatação de que uma mesma função possa ser afetada por mais de um composto, é um fator que complica no entendimento das inter-relações entre efeitos e causas (EINHELLIG, 1995; SEIGLER, 1996).

Outro fator que pode explicar a complexa relação entre concentração e efeito, nos ensaios de alelopatia, é o fato de que um aleloquímico possui dois

atributos complementares: estimulação e inibição, sendo que ambos possuem uma resposta sigmoideal à concentração de aleloquímicos (AN; JOHNSON e LOVETT, 1993).

Diante dessas evidências, sugere-se que o extrato etanólico bruto e a fração clorofórmio de *Dorstenia multiformis* possuam no mínimo dois agentes aleloquímicos, sendo um com expressiva atividade inibitória e outro com uma sutil atividade estimulatória, e que essas atividades oscilem de acordo com a concentração utilizada, podendo, em algum momento (com o aumento da concentração), a atividade estimulatória anular a atividade inibitória e, em seguida, esta pode ser novamente expressa, já que, as atividades relacionadas a enzimas, por exemplo, podem deixar de aumentar com o aumento da concentração (por saturação enzimática) e, dessa forma, sugere-se que a atividade inibitória novamente sobressairia-se em relação à atividade estimulatória, evidenciando o efeito inibitório.

#### 5.8.2 Avaliação do crescimento

Esse parâmetro é avaliado pela comparação das médias das leituras de crescimento. De acordo com a tabela 13, estatisticamente, houve inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* ao utilizarmos a fração hexano nas maiores concentrações testadas; a radícula foi influenciada nas diluições de 0,6 e 0,4mg, e o hipocótilo teve seu crescimento influenciado inibitoriamente pela concentração de 0,6mg da fração hexano.

TABELA 13 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO COM EXTRATO E FRAÇÕES DE *Dorstenia multiformis*

| TRATAMENTO | REPETIÇÃO | RADÍCULA   |        |        |        | HIPOCÓTILO |        |        |        |
|------------|-----------|------------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|--------|
|            |           | MÉDIA (MM) |        |        |        | MÉDIA (MM) |        |        |        |
|            |           | EBE        | FH     | FC     | FAE    | EBE        | FH     | FC     | FAE    |
| 0,6mg      | 1         | 37,5 a     | 29,1 a | 44,3 c | 38,7 c | 25,5 b     | 19,8 a | 29,6 b | 25,2 b |
|            | 2         | 41,2 b     | 32,1 a | 44,7 c | 31,9 b | 26,4 b     | 18,4 a | 29,3 b | 21,7 a |
|            | 3         | 40,2 b     | 31,1 a | 40,1 c | 42,6 c | 25,4 b     | 22,9 a | 26,8 b | 22,9 a |
|            | 4         | 38,7 b     | 31,7 a | 49,8 c | 41,0 c | 28,1 b     | 20,0 a | 28,7 b | 26,9 b |
| 0,4mg      | 1         | 37,3 a     | 27,7 a | 43,6 c | 18,5 a | 28,1 b     | 21,2 a | 26,0 b | 24,0 b |
|            | 2         | 38,4 b     | 34,8 a | 41,1 c | 32,0 b | 29,1 b     | 22,2 a | 27,1 b | 19,0 a |
|            | 3         | 35,6 a     | 31,3 a | 42,2 c | 37,7 c | 28,0 b     | 24,7 b | 30,2 b | 21,4 a |
|            | 4         | 36,8 a     | 34,1 a | 44,6 c | 35,3 b | 28,9 b     | 26,2 b | 30,3 b | 23,4 a |
| 0,3mg      | 1         | 43,8 b     | 36,3 a | 39,3 c | 50,5 c | 24,1 b     | 20,6 a | 26,2 b | 27,5 b |
|            | 2         | 41,0 b     | 37,3 a | 42,7 c | 42,8 c | 26,1 b     | 24,3 b | 28,6 b | 25,6 b |
|            | 3         | 39,1 b     | 39,1 b | 43,6 c | 33,5 b | 25,9 b     | 19,5 a | 29,8 b | 22,5 a |
|            | 4         | 44,7 b     | 34,6 a | 40,1 c | 31,9 b | 29,4 b     | 23,9 b | 29,9 b | 20,9 a |
| 0,2mg      | 1         | 37,3 a     | 40,1 b | 42,2 c | 33,5 b | 25,9 b     | 25,3 b | 27,8 b | 21,9 a |
|            | 2         | 41,1 b     | 34,6 a | 41,6 c | 37,5 c | 25,2 b     | 25,5 b | 21,5 b | 26,9 b |
|            | 3         | 38,2 b     | 36,8 a | 19,3 a | 45,4 c | 26,4 b     | 25,3 b | 15,0 a | 29,8 b |
|            | 4         | 41,0 b     | 33,7 a | 38,0 c | 45,1 c | 25,4 b     | 24,8 b | 29,2 c | 25,2 b |
| 0,1mg      | 1         | 40,2 b     | 36,5 a | 40,4 c | 45,3 c | 24,5 b     | 26,1 b | 19,2 a | 25,3 b |
|            | 2         | 38,0 b     | 38,5 b | 42,3 c | 45,1 c | 26,0 b     | 25,1 b | 20,0 a | 23,9 a |
|            | 3         | 40,1 b     | 18,5 a | 40,3 c | 42,1 c | 25,8 b     | 26,2 b | 21,3 a | 27,9 b |
|            | 4         | 41,1 b     | 32,0 a | 37,5 c | 43,4 c | 25,6 b     | 26,9 b | 24,7 b | 28,0 b |
| 0,05mg     | 1         | 36,8 a     | 35,6 a | 45,4 c | 38,2 c | 23,6 b     | 28,6 b | 27,8 b | 26,9 b |
|            | 2         | 41,3 b     | 33,8 a | 45,4 c | 42,7 c | 23,9 b     | 24,5 b | 27,0 b | 26,9 b |
|            | 3         | 41,4 b     | 34,9 a | 32,9 b | 42,0 c | 25,0 b     | 26,0 b | 20,9 a | 26,6 b |
|            | 4         | 41,5 b     | 38,8 b | 45,0 c | 45,6 c | 26,8 b     | 27,6 b | 26,0 b | 26,4 b |
| 0,025mg    | 1         | 39,1 b     | 35,7 a | 44,1 c | 35,2 b | 22,6 a     | 26,2 a | 30,3 b | 20,4 a |
|            | 2         | 43,5 b     | 33,8 a | 45,4 c | 41,9 c | 26,5 b     | 23,3 a | 27,3 b | 23,6 a |
|            | 3         | 42,6 b     | 34,9 a | 46,6 c | 45,9 c | 26,2 b     | 26,4 b | 32,4 b | 24,7 b |
|            | 4         | 41,7 b     | 38,8 b | 47,0 c | 41,1 c | 19,8 a     | 26,9 b | 30,2 b | 23,2 a |
| Controle   | 1         | 52,1 b     |        | 38,3 c |        | 26,0 b     |        | 27,4 b |        |
|            | 2         | 45,3 b     |        | 49,4 c |        | 24,2 b     |        | 31,0 b |        |
|            | 3         | 49,7 b     |        | 50,4 c |        | 25,5 b     |        | 32,3 b |        |
|            | 4         | 42,3 b     |        | 47,6 c |        | 24,5 b     |        | 26,8 b |        |

NOTAS: (1) EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FC= Fração Clorofórmio; FAE= Fração Acetato de Etila.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

#### 5.8.2.1 Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

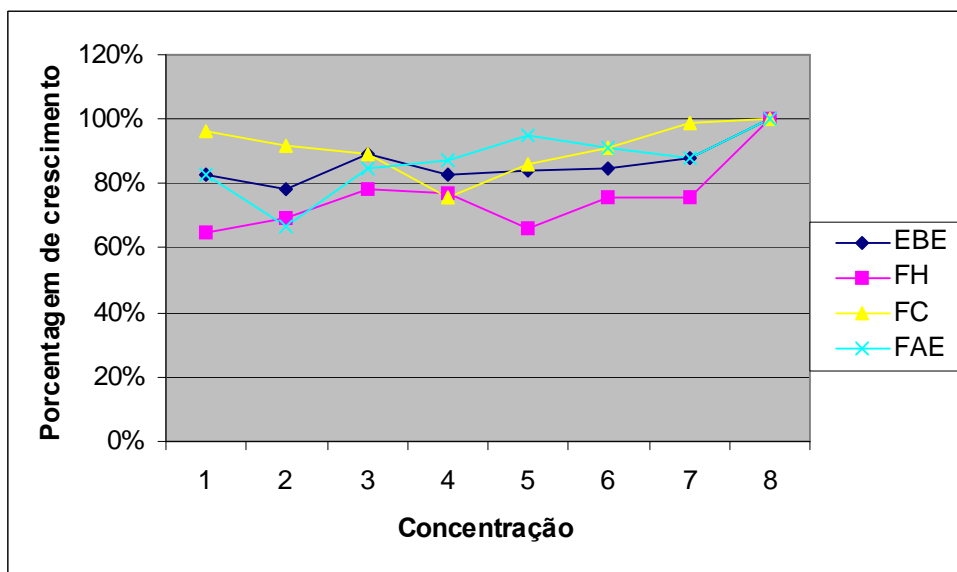
A avaliação da porcentagem de crescimento tem por objetivo demonstrar

visualmente e comparativamente as influências das amostras testadas, sobre as sementes de *Lactuca sativa*, bem como visualizar a amostra capaz de provocar a influência mais significativa sobre o crescimento dessas sementes.

A menor porcentagem de crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* pode ser observada nos gráficos 1 e 2, utilizando-se a fração hexano de *Dorstenia multiformis*.

Plântulas com menores taxas de crescimento apresentam menor incorporação de suprimento de reserva dos tecidos pelo eixo embrionário, por meio da menor capacidade de transformação e de suprimento de reserva, inviabilizando o pleno desenvolvimento do vegetal (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999).

GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Dorstenia multiformis*

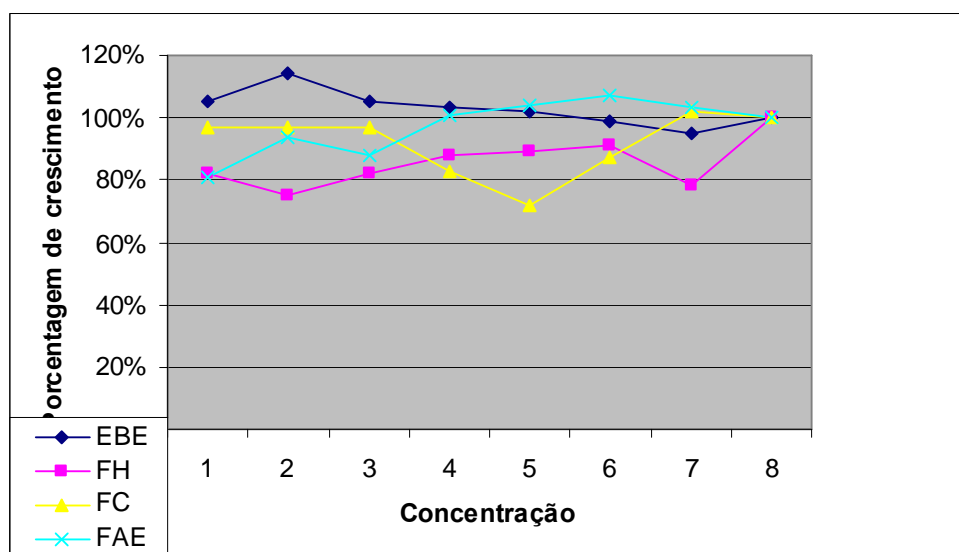


|     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 83% | 78% | 89% | 83% | 84% | 85% | 88% | 100% |
| 65% | 69% | 78% | 77% | 66% | 76% | 76% | 100% |
| 96% | 92% | 89% | 76% | 86% | 91% | 99% | 100% |
| 83% | 67% | 85% | 87% | 95% | 91% | 88% | 100% |

NOTAS: (1) EBE= Extrato Etanólico Bruto; FH= Fração Hexano; FC= Fração Clorofórmio; FAE= Fração Acetato de Etila

(2) CONCENTRAÇÕES: 1 – 0,6mg; 2 – 0,4mg; 3 – 0,3mg; 4 – 0,2mg; 5 – 0,1mg; 6 – 0,05mg; 7 – 0,025mg; 8 – controle.

GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Dorstenia multiformis*



|      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 105% | 114% | 105% | 103% | 102% | 99%  | 95%  | 100% |
| 82%  | 75%  | 82%  | 88%  | 89%  | 91%  | 78%  | 100% |
| 97%  | 97%  | 97%  | 83%  | 72%  | 87%  | 102% | 100% |
| 81%  | 94%  | 88%  | 101% | 104% | 107% | 103% | 100% |

NOTAS: (1) EBE= Extrato Etanólico Bruto; FH= Fração Hexano; FC= Fração Clorofórmio; FAE= Fração Acetato de Etila

(2) CONCENTRAÇÕES: 1 – 0,6mg; 2 – 0,4mg; 3 – 0,3mg; 4 – 0,2mg; 5 – 0,1mg; 6 – 0,05mg; 7 – 0,025mg; 8 – controle.

## 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.9.1 Ensaio pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio

Por esse método, os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR%(ác. ascórbico) e AAR%(rutina)) e os cálculos estabelecidos através das seguintes equações:

$$\text{AAR\% (ac. ascórbico)} = \frac{\text{Abs(amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs(ac. ascórbico)} - \text{Abs(branco)}} \cdot 100$$

$$\text{AAR\% (rutina)} = \frac{\text{Abs(amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs(rutina)} - \text{Abs(branco)}} \cdot 100$$



De acordo com os resultados apresentados, observa-se que todas as amostras testadas (extrato etanólico bruto, frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, e substâncias isoladas do resíduo do extrato bruto, denominadas amostras CRS1 e CRS2, demonstraram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, adquirindo a coloração verde característica, conforme apresentado na figura 40.

Para o extrato bruto etanólico (EB), a AAR(vitamina C) foi igual a 21,21% e para a fração hexano obteve-se o valor de 19,78% para a AAR(vitamina C), enquanto que para a fração clorofórmio, a AAR(vitamina C) foi de 34,49%. Para a fração acetato de etila obteve-se o valor de AAR(vitamina C) de 21,50% e para as substâncias isoladas do resíduo do extrato bruto obteve-se 8,87%, para a amostra CRS1, e 26,45%, para a amostra CRS2. Esses valores foram obtidos em relação a 100% da atividade total atribuída à vitamina C (ácido ascórbico).

Quando essas amostras foram comparadas com o padrão de rutina, a AAR(rutina) para o extrato etanólico bruto foi igual a 65,30% e para a fração hexano obteve-se o valor de 60,88%, enquanto que para a fração clorofórmio, a AAR(rutina) foi de 106,19%. A fração acetato de etila apresentou AAR(rutina) de 66,19% e as amostras CRS1 e CRS2 27,29% e 81,44%, respectivamente, valores esses obtidos em relação a 100% da atividade total atribuída à rutina.

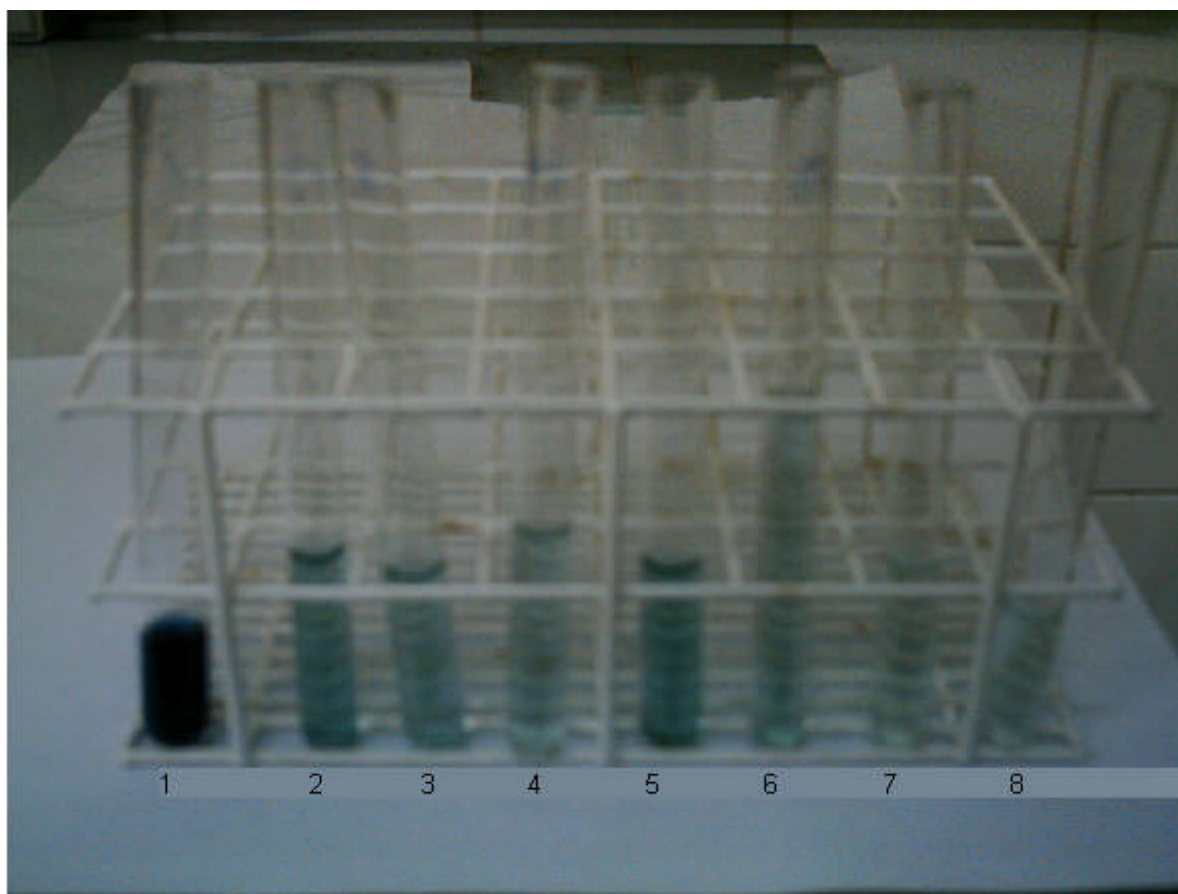
À partir dos resultados obtidos para a atividade antioxidante total do extrato etanólico bruto, frações e substâncias isoladas do resíduo do extrato bruto, pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio, sugere-se que a atividade antioxidante observada para o extrato bruto e as frações não seja devida principalmente aos compostos psoraleno e bergapteno, presentes na amostra CRS1, uma vez que os valores de atividade antioxidante total obtidos para essa amostra encontram-se significativamente abaixo daqueles obtidos para as demais amostras testadas, atribuindo-se uma baixa atividade antioxidante para esses compostos cumarínicos, por comparação com ambos os padrões utilizados (vitamina C e rutina).

Dessa forma, considerando-se que tanto o extrato etanólico bruto quanto as frações obtidas do extrato tratam-se de misturas complexas de componentes químicos, pode-se supor que a atividade antioxidante mais pronunciada, observada para essas amostras, em relação à amostra CRS1,

possa ser devida a um sinergismo dos componentes presentes nas referidas amostras com as cumarinas psoraleno e bergapteno, tornando mais pronunciada a atividade antioxidante observada para esses compostos. Além disso, pode-se sugerir a presença, nessas amostras, dos compostos terpenóides presentes na amostra CRS2, uma vez que tais compostos apresentaram uma atividade antioxidante relativa significativa, quando comparado aos padrões vitamina C e rutina.

Considere-se ainda que a fração clorofórmio apresentou atividade antioxidante relativa superior, quando comparada ao padrão de atividade antioxidante rutina. Dessa forma, a fração clorofórmio pode ser considerada um antioxidante em potencial, com possibilidade de aplicação na terapêutica, e inclusive com possibilidade de separação de ativos.

FIGURA 37 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



NOTA: TUBOS: 1= VITAMINA C; 2= RUTINA; 3= EXTRATO ETANÓLICO BRUTO; 4= FRAÇÃO HEXANO; 5= FRAÇÃO CLOROFÓRMIO; 6= FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; 7= CRS1; 8= CRS2

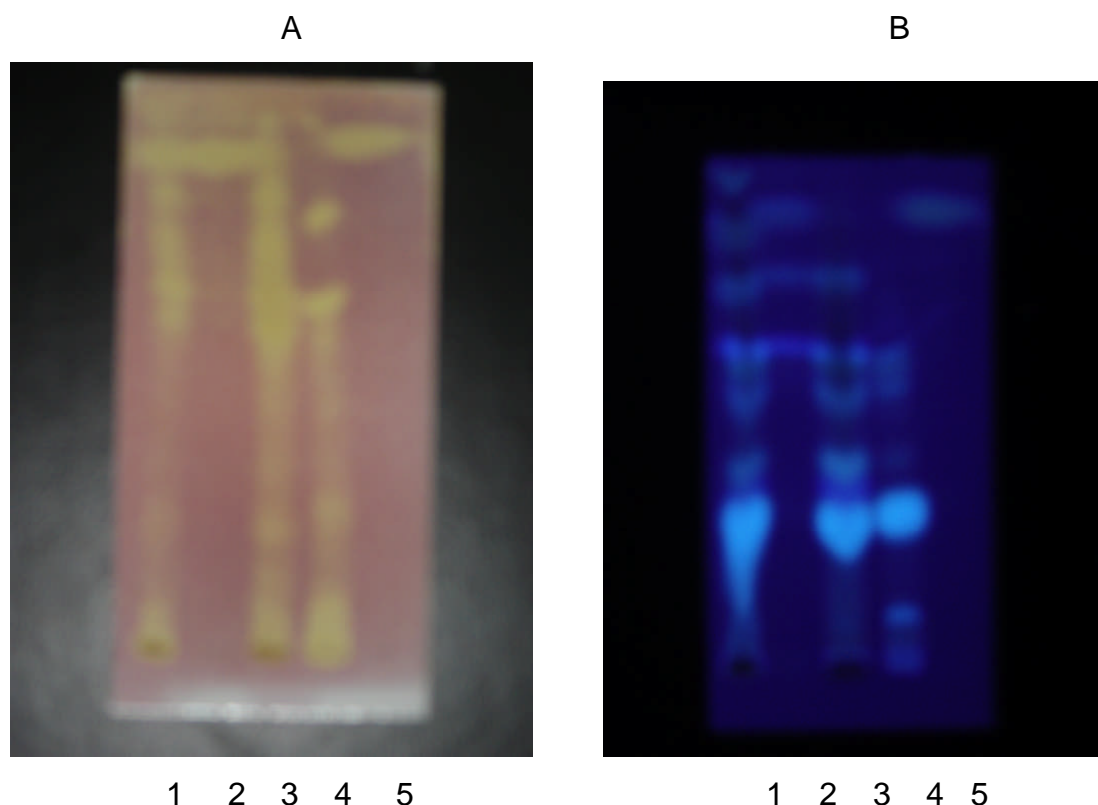
#### 5.9.2 Ensaio pelo método de cromatografia em camada delgada

O ensaio de atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada possibilitou a visualização de substâncias com tal atividade, por meio do reativo DPPH, indicativo de atividade antioxidante. O DPPH é um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio (EROs); dessa forma, ele pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente. Possui coloração violeta intenso (BOILS, 1958). De acordo com CONFORTI *et al* (2002) e WAGNER e BLADT (1996), o DPPH, quando aplicado em placa cromatográfica na forma de solução alcoólica, adquire coloração amarelo ouro

característica em presença de substâncias com atividade antioxidante, não apresentando alteração de cor na ausência destas.

Uma vez verificada a presença de atividade antioxidante nas amostras testadas por meio do ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio, o ensaio de cromatografia em camada delgada permite avaliar a atividade das substâncias presentes nas amostras isoladamente, com vistas à separação de ativos farmacêuticos.

FIGURA 38 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO ENSAIO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (A – com revelador DPPH; B – visualização em câmara de UV)



NOTA: PONTOS: 1-Extrato etanólico bruto; 2-Fração hexano; 3-Fração clorofórmio; 4-Fração acetato de etila; 5-CRS1.

De acordo com a figura 38, observa-se a presença de um grande número de substâncias com atividade antioxidante nas amostras testadas, especialmente na fração clorofórmio, confirmando o resultado de atividade antioxidante significativa obtido para essa amostra com o reativo fosfomolibdênio. Assim sendo, a fração clorofórmio apresenta potencial para futuras investigações, com possibilidade de isolamento de substâncias com

atividade antioxidante comparável aos padrões de atividade antioxidante já existentes.

## 6. CONCLUSÕES

A pesquisa fitoquímica preliminar realizada com a espécie *Dorstenia multiformis* evidenciou a presença dos seguintes grupos químicos: flavonóides, cumarinas e triterpenos, no extrato alcoólico a 20%, e taninos condensados, aminogrupos e ácidos fixos, no extrato aquoso.

Através do estudo fitoquímico direcionado verificou-se, inicialmente, por meio de cromatografia em camada delgada, a presença de um composto cumarínico principal, além de outros compostos cumarínicos e compostos terpenóides, no resíduo obtido do extrato bruto.

A separação por cromatografia em coluna de sílica-gel e posterior identificação por métodos espectrométricos, evidenciou a presença de dois compostos cumarínicos, identificados como psoraleno e bergapteno, e dois compostos terpenóides, a saber, acetato de  $\alpha$ -amirina e acetato de  $\beta$ -amirina, a partir do resíduo do extrato bruto. O doseamento da amostra CRS1 por cromatografia líquida de alta eficiência evidenciou 90% de psoraleno e 10% de bergapteno, nessa amostra.

Os constituintes químicos acetato de  $\alpha$ -amirina e acetato de  $\beta$ -amirina podem servir como marcadores da espécie, o que oportuniza maior segurança na aquisição de *Dorstenia multiformis* pela indústria farmacêutica.

O ensaio alelopático realizado com o extrato bruto e frações evidenciou atividade inibitória da germinação e do crescimento das sementes de *Lactuca sativa* por *Dorstenia multiformis*. O efeito inibitório da germinação foi observado para o extrato etanólico bruto e as frações hexano e clorofórmio, nas maiores concentrações utilizadas dessas amostras. Para o crescimento observou-se influência inibitória com a utilização da fração hexano nas maiores concentrações testadas, sendo que a menor concentração que apresentou efeito foi de 0,4mg de amostra.

Na atividade antibacteriana utilizando difusão em gel, evidenciou-se que 785 $\mu$ g de extrato bruto etanólico de *Dorstenia multiformis* inibe o desenvolvimento de *Salmonella thiphymurium*. A bactéria *Staphylococcus epidermidis* teve seu crescimento inibido em presença da fração hexano na concentração de 190 $\mu$ g e da fração clorofórmio na concentração de 233,5 $\mu$ g. Observou-se, também, influência inibitória, porém bastante sutil, do extrato

bruto e fração clorofórmio sobre a bactéria *Klebsiella pneumoniae*; a bactéria *Staphylococcus aureus* foi influenciada pelo extrato bruto e frações hexano e clorofórmio e o *Staphylococcus epidermidis* também sofreu uma sutil inibição em presença da fração hexano. Essa influência sutil pode ser devida a baixa polaridade dos componentes das amostras, dificultando sua difusão pelo ágar.

Ao utilizar-se diluição em caldo para testar a concentração mínima que apresenta atividade antimicrobiana, evidenciou-se que 38mg da fração hexano é capaz de inibir o desenvolvimento de *Escherichia coli*. Observou-se, ainda, no teste de concentração inibitória mínima, atividade moderada contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, para todas as amostras testadas, e uma fraca atividade contra as bactérias *Escherichia coli* (extrato bruto e frações clorofórmio e acetato de etila), *Klebsiella pneumoniae*, para todas as amostras testadas, *Salmonella thyphimurium* (extrato bruto e fração hexano) e *Streptococcus pyogenes* (extrato bruto e frações hexano e acetato de etila).

Verificou-se a presença de atividade antioxidante no extrato bruto, frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, e substâncias isoladas de *Dorstenia multiformis*, destacando-se a fração clorofórmio, com atividade antioxidante superior ao padrão rotina. Por meio de cromatografia em camada delgada, visualizou-se várias substâncias presentes no extrato e frações, com atividade antioxidante, especialmente na fração clorofórmio, possibilitando a separação de substâncias ativas.

## REFERÊNCIAS

- ABEGAZ, B.M.; NGADJUI, B.T.; DONGO, E.; NGAMENI, B.; NINDI, M.N.; BEZABIH, M. Chalcones and other constituents of *Dorstenia prorepens* and *Dorstenia zenkeri*. *Phytochemistry*, v. 59(8), p. 877-883, 2002.
- ABEGAZ, B.M.; NGADJUI, B.T.; DONGO, E.; TAMBOUE, H. Prenylated chalcones and flavones from the leaves of *Dorstenia kameruniana*. *Phytochemistry*, v. 49(4), p. 1147-1150, 1998.
- ANDRADE, C. A. Flores de *Acacia podalyriaefolia* A. Cunn. (Leguminosae – Mimosoideae): Avaliação fitoquímica e das atividades antibacteriana e alelopática. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – UFPR.
- ARNAO, M. B. **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical: a practical case.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 419-421, 2000.
- BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G.; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical Constituents from *Himatanthus articulate*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 9, n. 5, p.430-434, 1998.
- BAUER, L.; NOLL, I.B.; Furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. *Cad. farm.*, v. 2(2), p. 163-170, 1986.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brasilian medicinal plant research. *J. of Ethnopharmacol.*, 49(2), p. 53-67, 1993.
- CACERES, A.; RASTRELLI, L.; DE SIMONE, F.; DE MARTINO, G.; SATURNINO, C.; SATURNINO, P.; AQUINO, R. Furanocumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, v. 72(4), p. 376-381, 2001.
- CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; BARISON, A.; HONDA, N.K. Simultaneous determination of furanocumarins in infusions and decoctions from "Carapiá" (*Dorstenia* species) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural na Food Chemistry*, v. 50(6), p.1465-1469, 2002.
- CASAGRANDE, C.; RONCHETTI, F.; RUSSO, G. Structure of syriogenin. *Tetrahedron*, v. 30(19), p. 3587-3589, 1974.
- CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P.. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium*, Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 479-483, 2002.



CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. 4. ed. Petrópolis: Ed. Vozes, p. 164-165, 2001.4. ed.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, p. 195-198, 1981.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE F. Pottential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v.61, n. 5, p. 573-578, 2002.

DIAS, J. F. G. Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd. Curitiba, p. 27, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – UFPR.

DIMO, T.; RAKOTONIRINA, A.; TAN, P.V.; DONGO, E.; DONGMO, A.B.; KAMTCHOUING, P.; AZAY, J.; ABEGAZ, B.M.; CROS, G.; NGADJUI, T.B. Antihypertensive effects of *Dorstenia psilurus* extract in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. *Phytomedicine-Jena*, v. 8(2), p. 101-106, 2001.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, S. H. (sup.) *et al.* Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 131 p., 1998.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**. Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FRANÇA, S. C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.499-525, 2001.

FRANKE, K.; PORZEL, A.; MASAOU, M.; ADAM, G.; SCHMIDT, J. Furanocumarins from *Dorstenia gigas*. *Phytochemistry*, v. 56(6), p. 611-621, 2001.

GALLEGOS, R. S.; ROQUE, N. F. Análise de de misturas de triterpenos por RMN de <sup>13</sup>C. **Química nova**. v. 13(4), 1990. p.278 -281.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto alegre: UFSC/UFRS, p.13-26, 2001.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; TALLY, J.D.; KLAYMAN, D.L. Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). *Planta Med.*, v. 58(5), p. 436-441, 1992.

JOLY, A.B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. Câmara Brasileira do Livro, p. 232-239, 1975.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWEL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2. ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993.

LAPA, A.J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: URS, 1999.

LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; LAGE, C.S.; LEITÃO, A.C. Photosensitization and mutation induced in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains by dorstenin, a psoralen analog isolated from *Dorstenia bahiensis*. *Planta Médica*, v. 67(9), p. 820-824, 2001.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. p. 503-523.

MATOS, J.M.D.; MATOS, M.E.O. **Farmacognosia – Curso teórico-prático**. Fortaleza: Edições UFC, p. 223-230, 1989.

MIGUEL, M. D. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Ed. Robe, p. 30-31, 1999.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. ***Dorstenia multiformis***. Disponível em :[www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search-vast](http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search-vast) Acessos em: 25 fev. 2004 e 03 jul. 2005.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, n.1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, E. A. Marcha Sistemática de Análise em Fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**. Curitiba, v. 47, n. 1, p. 3-19. 1979.

NGADJUI, B.T.; DONGO, E.; HAPPI, E.N.; BEZABIH, M.T.; ABEGAZ, B.M. Prenylated flavones and phenylpropanoid derivatives from roots of *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry*, v. 48(4), p. 733-737, 1998.

NGADJUI, B.T.; DONGO, E.; ABEGAZ, B.M.; FOTSO, S.; TAMBOUE, H. Dinklagins A, B and C: three prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of *Dorstenia dinklagins*. *Phytochemistry*, v. 61(1), p. 99-104, 2002.

NGADJUI, B.T.; ABEGAZ, B.M.; DONGO, E.; TAMBOUE, H.; FOGUE, K. Geranylated and prenylated falvonoids from the twigs of *Dorstenia manii*. *Phytochemistry*, v. 48(2), p. 349-354, 1998.

NGAJUI, B.T.; KOUAM, S.F.; DONGO, E.; KAPCHE, G.W.; ABEGAZ, B.M. Prenylated flavonoids from the aerial parts of *Dorstenia manii*. *Phytochemistry*, v. 55(8), p. 915-919, 2000.

PEITZ, C. **Estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acácia longifolia* Andr. (Willd)**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 41-62, 2001.

ROJAS, L.S.; SANTILLAN, R.L.; DOMINGUEZ, M.A.; GUTIERREZ, A. Furocoumarins of three species of the genus *Dorstenia*. *Phytochemistry*, v. 50(5), p. 863-868, 1999.

RUPPELT B.M.; PEREIRA, E.F.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom - I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p. 203-205, 1991.

SACRAMENTO, H.T. Legislação para produção, comercialização e uso de plantas medicinais. In: JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS. *Anais*. Lages, p. 57-61, 2001.

SILVA, V. C. Análise dos flavonóides de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. *LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE*. p. 1, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.O.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da UFRS, p.176, 1986.

SWAIN, L.A.; DOWNUM, K.R. Light-activated toxins of the Moraceae. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 18(2-3), p. 153-156, 1990.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TOVAR, M.R.; CORTES, G.R.; SANTOS, S.N.F.; JOSEPH, N.P. Isolation, total synthesis, and relative stereochemistry of a dihydrofuranocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *J. Nat. Prod.*, v. 61(10), p. 1216-1220, 1998.

TSOPMO, A.; TENE, M.; KAMNAING, P.; AYAFOR, J.F.; STERNER, O. A new diels-alder-type adduct flavonoid from *Dorstenia barteri*. J. Nat. Prod., v. 62(10), p. 1432-1434, 1999.

TSOPMO, A.; TENE, M.; KAMNAING, P.; NGNOKAM, D.; AYAFOR, J.F.; STERNER, O. Geranylated flavonoids from *Dorstenia poinsettifolia*. Phytochemistry, v. 48(2), p. 345-348, 1998.

UCHIYAMA, T.; HARA, S.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Seco-Adianane-type triterpenoids from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). Phytochemistry-Oxford, v. 60(8), p. 761-764, 2002.

VILEGAS, W.; VILEGAS, J.H.Y.; POZETTI, G.L. Cromatografia de permeação em gel das furanocumarinas de *Dorstenia heringeri* Car. & Val. Rev. Ciênc. Farm., v. 14, p. 133-138, 1992.

VILEGAS, J.H.Y.; LANCAS, F.M.; VILEGAS, W.; POZETTI, G.L. Further triterpenes, steroids and furanocumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). J. Braz. Chem. Soc., v. 8(5), p. 529-535, 1997.

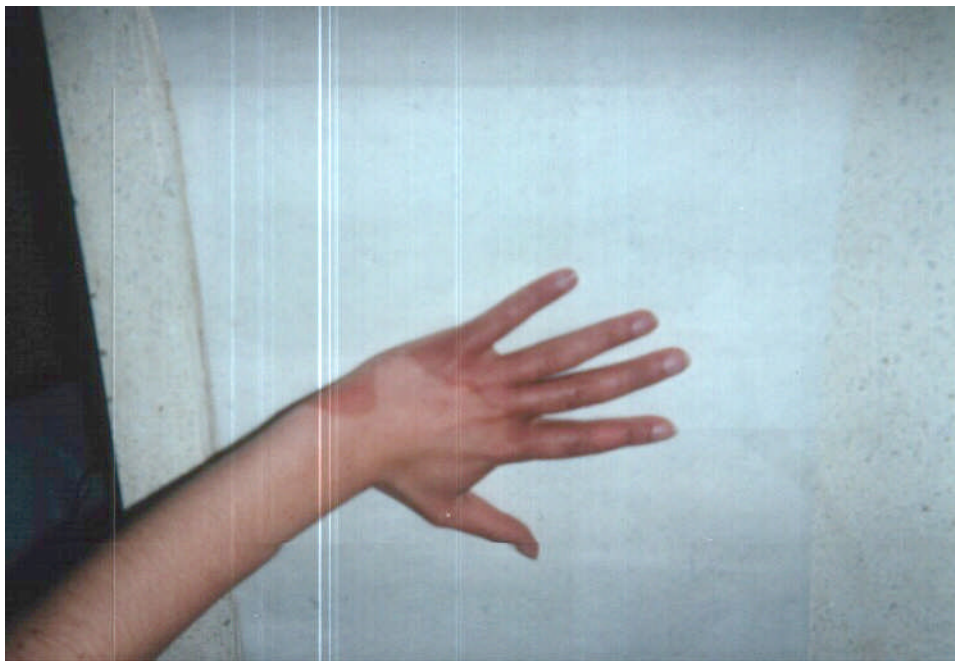
WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. J. of Ethnopharmacol., 51, p.239-254, 1996.

WOLDU, Y.; ABEGAZ, B.; BOTTA, B.; DELLE, M.G.; DELLE, M.F. Styrenes from *Dorstenia barnimiana*. Phytochemistry, v. 27(4), p. 1227-1228, 1988.

YOUNGSON, R. **Como combater os Radicais Livres**. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, 1996. p. X-XIII.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-75.

## ANEXO



A figura 15 é ilustrativa de reação de fotossensibilidade ocorrida por contato com as amostras obtidas de *Dorstenia multiformis* Miquel e posterior exposição aos raios solares. O contato com as amostras provocou sensibilização e a exposição aos raios solares desencadeou reação com Sintomas de alergia (coceira) e queimadura.